

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Neubauer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

---

**IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen und  
IL-4 sowie IFN- $\gamma$  mRNA-Expression  
in MALT-Lymphomen des Magens**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von

Natascha Schnitzer aus Oelde

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 23.09.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. A. Neubauer
1. Korreferent:	PD Dr. W. Meißner

## Meinen Eltern



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 LYMPHOME VOM MALT-TYP.....	1
1.1.1 <i>Definition und Klassifikation</i> .....	1
1.1.2 <i>Epidemiologie</i> .....	1
1.1.3 <i>Pathologie</i> .....	2
1.1.3.1 <i>Histologie und Immunphänotypisierung</i> .....	2
1.1.3.2 <i>Molekulargenetik</i> .....	2
1.1.4 <i>Ätiologie und Pathogenese</i> .....	3
1.1.5 <i>Klinisches Bild und Stadieneinteilung</i> .....	5
1.1.6 <i>Diagnostik</i> .....	6
1.1.7 <i>Therapie und Prognose</i> .....	7
1.2 KONZEPT DER T <sub>H</sub> 1-/T <sub>H</sub> 2-ZELLEN.....	7
1.2.1 <i>Einleitung</i> .....	7
1.2.2 <i>Definition</i> .....	8
1.2.3 <i>Funktionen</i> .....	8
1.2.4 <i>T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen als polarisierte Formen der spezifischen Immunantwort</i> .....	9
1.2.5 <i>Mechanismen der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung</i> .....	9
1.2.5.1 <i>Zytokine als Faktoren der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung</i> .....	9
1.2.5.2 <i>Weitere Faktoren der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung</i> .....	10
1.2.6 <i>Transkriptionsfaktoren in der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2- Polarisierung</i> .....	11
1.2.7 <i>Physiologische und pathologische Konsequenzen der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung</i> ....	12
1.2.7.1 <i>Infektionen</i> .....	12
1.2.7.2 <i>Erkrankungen des atopischen Formenkreises</i> .....	12
1.2.7.3 <i>Spektrum weiterer T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-assoziiierter Erkrankungen</i> .....	13
1.3 IL-4 REZEPTOR .....	13
1.3.1 <i>Struktur und Funktion des IL-4 Rezeptors</i> .....	13
1.3.2 <i>Signaltransduktion über den IL-4 Rezeptor</i> .....	14
1.3.3 <i>IL-4R<math>\alpha</math> Polymorphismen</i> .....	15
1.3.3.1 <i>Definition</i> .....	15
1.3.3.2 <i>Assoziation der IL-4R<math>\alpha</math> Polymorphismen mit bestimmten Erkrankungen</i> .....	16
1.4 FRAGESTELLUNG .....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1 VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	20
2.1.1 <i>Reagenzien</i> .....	20
2.1.2 <i>Enzyme</i> .....	21
2.1.3 <i>Kits</i> .....	21
2.1.4 <i>Lösungen und Puffer</i> .....	21
2.1.5 <i>Oligonukleotide</i> .....	22
2.1.6 <i>Großgeräte und sonstige Materialien</i> .....	23
2.2 IL-4 REZEPTOR $\alpha$ POLYMORPHISMEN .....	24
2.2.1 <i>Patienten- und Kontrollkollektiv</i> .....	24
2.2.2 <i>Probenaufbereitung</i> .....	25
2.2.3 <i>Allelspezifische IL-4 Rezeptor <math>\alpha</math>-PCR</i> .....	25
2.2.4 <i>Klonierung</i> .....	29
2.2.4.1 <i>PCR und Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel</i> .....	29
2.2.4.2 <i>Ligation, Transformation und Plasmidisolation</i> .....	30
2.2.4.3 <i>Restriktionsverdau</i> .....	32
2.2.5 <i>Sequenzierung</i> .....	32

2.2.6 Datenauswertung.....	34
2.3 IL-4 UND IFN- $\gamma$ -EXPRESSION .....	35
2.3.1 Patienten und Kontrollkollektiv.....	35
2.3.2 Probenaufbereitung: Extraktion von mRNA und cDNA-Synthese.....	35
2.3.3 Konventionelle IL-4 und IFN- $\gamma$ -PCR.....	37
2.3.4 IL-4 und IFN- $\gamma$ - Real-Time-PCR.....	38
2.3.4.1 Prinzip der Real-Time-PCR.....	38
2.3.4.2 IL-4 und IFN- $\gamma$ -Real-Time-PCR.....	40
2.3.4.3 Quantifizierung der IL-4 und IFN- $\gamma$ -Real-Time-PCR.....	41
2.3.5 Datenauswertung.....	42
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
3.1 ERGEBNISSE DER IL-4 REZEPTOR $\alpha$ POLYMORPHISMEN .....	43
3.1.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten .....	43
3.1.2. Allelspezifische IL-4 Rezeptor $\alpha$ -PCR.....	43
3.1.3 Sequenzierung.....	47
3.2. ERGEBNISSE DER IL-4 UND IFN- $\gamma$ -EXPRESSION .....	49
3.2.1 Konventionelle PCR.....	49
3.2.2 Real-Time-PCR.....	50
3.2.2.1 Standardkurven und Präzision.....	50
3.2.2.2 Ergebnisse der IL-4 und IFN- $\gamma$ Real-Time-PCR.....	51
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
4.1 METHODENDISKUSSION .....	55
4.2 ERGEBNISDISKUSSION .....	55
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
5.1 DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	64
5.2 ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	66
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....	76
DANKSAGUNG .....	77

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-Presenting Cell; antigenpräsentierende Zelle
API	Apoptose inhibierendes Protein
AU	Arbitrary Unit; arbiträre Einheit
CD 4+ T-Lymphozyt	CD 4 positive T-Zelle, T <sub>H</sub> -Zelle, T-Helferzelle
Ct	Threshold Cycle, Grenzwert-Zyklus
ELISA	Enzyme Linked Immunoassay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorting, Durchflussszytometrie
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IKK	I $\kappa$ B Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-4R	Interleukin-4 Rezeptor
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JAK	Januskinasen
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue; Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MALT	MALT-Lymphoma associated Translocation
MHC	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitäts-komplex
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription, Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T-Cell-Receptor, T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor





## **1 Einleitung**

### **1.1 Lymphome vom MALT-Typ**

#### **1.1.1 Definition und Klassifikation**

Isaacson und Wright stellten Anfang der 80er Jahre ein neues Konzept für die Entstehung der extranodalen malignen Lymphome in Magen, Speicheldrüse, Lunge und Schilddrüse vor: diese Lymphome entwickeln sich demnach aus sekundärem mukosaassoziierten lymphatischen Gewebe (Mucosa-Associated-Lymphoid Tissue; MALT) <sup>1</sup>(Isaacson und Wright 1983; Isaacson und Wright 1984).

Die Lymphome des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (Lymphome vom MALT-Typ) gehören der Gruppe der primär extranodalen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) an. Die Einteilung der NHL erfolgt nach der 1994 erstellten revidierten europäisch-amerikanischen Klassifikation lymphatischer Neoplasien (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms; R.E.A.L.). Das Lymphom vom MALT-Typ ist der Gruppe der peripheren B-Zell-Neoplasien zugeordnet und wird als Marginalzonen B-Zell Lymphom, Subtyp extranodal, MALT-Typ bezeichnet (Harris et al. 1994).

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Zwischen 25 und 40 % der NHL entstehen primär extranodal (Isaacson 1999b). Die gastrointestinalen Lymphome bilden die größte Untergruppe der primär extranodalen NHL. Sie finden sich zu 50-80 % im Magen, zu 15-20 % im Dünndarm einschließlich der Ileozökalregion und zu 2-10 % im Kolon (Koch und Schmoll 1999).

Die primären gastrischen Lymphome machen ca. 1-7 % aller malignen Neoplasien des Magens und etwa 8 % aller NHL aus (Cogliatti et al. 1991; The NHL Classification Project 1997). Die meisten Patienten mit MALT-Lymphomen sind

---

<sup>1</sup> Unter mukosaassoziiertem lymphatischen Gewebe versteht man ein lockeres lymphatisches Gewebe mit kleinen Agglomeraten aus T-, B- und Plasmazellen, das sich vorwiegend in der Submukosa von Gastrointestinal- (GALT), Urogenital- und Bronchialtrakt (BALT) befindet. Das gastrointestinale MALT verteilt sich auf vier Kompartimente: Peyer's-Plaques, Lamina propria, intraepitheliale T-Zellen und Mesenteriallymphknoten (Isaacson 1999b). In Organen, die primär frei von lymphatischem Gewebe sind, wie dem Magen, kann es zur Entwicklung von sekundärem MALT kommen.

älter als 40 Jahre; der Altersmedian liegt bei 63 Jahren. In der Geschlechtsverteilung zeigt sich kein Unterschied (Zucca et al. 2000; Isaacson 1999c).

### **1.1.3 Pathologie**

#### **1.1.3.1 Histologie und Immunphänotypisierung**

Die histologischen Charakteristika der MALT-Lymphome ähneln denen der Peyer's Plaques: reaktive, nicht neoplastische Lymphfollikel werden in der Region, die der Marginalzone der Peyer's Plaques entspricht, von den Lymphomzellen infiltriert (Marginalzonen B-Zell Lymphom). Die Tumorzellen sind klein und ähneln Follikelzentrumzellen (Zentrozyten). Ein weiteres Merkmal sind die so genannten lymphoepithelialen Läsionen, die durch die Invasion von Drüsen und Krypten durch Lymphomzellaggregate entstehen (Isaacson 1999b; Isaacson 1999c).

Der Immunphänotyp der B-Zellen der MALT-Lymphome zeigt eine fast vollständige Homologie zu den normalen Marginalzonen B-Zellen. Beide Zelltypen exprimieren die Pan-B-Marker CD19, CD20 und CD79a sowie CD21 und CD35. Sie sind negativ für CD5, CD10 sowie CD 23. Die Zellen sind IgM positiv und IgD negativ (Zucca et al. 2000; Isaacson 1999a).

#### **1.1.3.2 Molekulargenetik**

Die Translokation t(11;18)(q21;q21) findet sich in ca. 40 % der Fälle niedrigmaligner MALT-Lymphome (Ott et al. 1997; Auer et al. 1997; Baens et al. 2000; Liu et al. 2002). Die beteiligten Gene konnten von Dierlamm et al. näher charakterisiert werden: Sie identifizierten ein neues Gen im Bereich 18q21, das MALT1 (MALT-Lymphoma associated Translocation) genannt wurde und von Uren et al. als eine Parakaspase, eine kaspaseähnliche Protease, identifiziert werden konnte (Dierlamm et al. 1999; Uren et al. 2000). Als Fusionspartner wurde das API2-Gen erkannt, das für das Apoptose inhibierende Protein API2 kodiert (Dierlamm et al. 1999). Das API2-MALT1-Fusionsprotein kann NF-κB (Nukleärer Faktor κB), einen für Lymphozytenaktivierung und -überleben wichtigen Transkriptionsfaktor aktivieren (Uren et al. 2000; Lucas et al. 2001). Eine zweite Translokation, die in weniger als 5 % der Fälle nachweisbar ist, die t(1;14)(p22;q32) versetzt das Bcl 10-Gen unter die Kontrolle des enhancer-Elementes des Ig-Schwere-Ketten-Genes

(Willis et al. 1999), was die Überexpression von Bcl 10 in MALT-Lymphomen zur Folge hat (Zhang et al. 1999). Bcl 10 spielt eine Rolle in der Regulation von Antigen-Rezeptor-Signalwegen und kann in diesem Zusammenhang NF- $\kappa$ B aktivieren (Gascoyne et al. 2003).

Wotherspoon et al. zeigten das Auftreten der Trisomie 3 in 60 % der MALT-Lymphom-Fälle (Wotherspoon et al. 1995). Eine weitere Studie konnte dieses hohe Vorkommen nicht bestätigen (Ott et al. 1998). Die biologische Bedeutung der Trisomie 3 bleibt bisher unklar. In ca. 17 % der Fälle konnten somatische c-myc- und p53 Mutationen in MALT-Lymphomen nachgewiesen werden (Peng et al. 1997; Du et al. 1995).

#### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

Die Voraussetzung für die Entwicklung von MALT-Lymphomen ist die Ausbildung von sekundärem lymphatischem Gewebe vom MALT-Typ. In den Speicheldrüsen bzw. der Schilddrüse kann sich sekundäres MALT im Rahmen der Autoimmunerkrankungen Sjögren-Syndrom bzw. Hashimoto-Thyreoiditis entwickeln (Hyjek et al. 1988; Hyjek und Isaacson 1988). Im Magen ist eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)<sup>2</sup> für die Entwicklung des sekundären MALT verantwortlich (Stolte und Eidt 1989; Wotherspoon et al. 1991). *H. pylori* ist von erheblicher Bedeutung für die Entwicklung und Progression der MALT-Lymphome. Im Jahr 1991 wurde erstmals nachgewiesen, dass Patienten mit MALT-Lymphomen fast regelmäßig (92 %) mit *H. pylori* infiziert sind (Wotherspoon et al. 1991). Diese Assoziation konnte in den darauf folgenden Jahren bestätigt werden (Eidt et al. 1994; Eck et al. 1997). Eine Fall-Kontroll-Studie konnte eine Assoziation zwischen einer erlittenen Infektion mit *H. pylori* und der Entwicklung eines gastrischen Lymphoms aufzeigen (Parsonnet et al. 1994). Hussell et al. zeigten in vitro, dass niedrigmaligne MALT-Lymphomzellen durch Inkubation mit *H. pylori* zur Proliferation angeregt werden können (Hussell et al. 1993). Schließlich zeigte sich, dass mittels *H. pylori*-Eradikation die Regression

---

<sup>2</sup> Das spiralige Bakterium *H. pylori* wurde erstmals 1983 von Marshall und Warren als gastrisches Pathogen erkannt (Marshall und Warren 1984). Die Bevölkerung in westlichen Staaten ist zu ca. 50 % mit *H. pylori* infiziert.

niedrigmaligner MALT-Lymphome erreicht werden kann (Wotherspoon et al. 1993; Bayerdörffer et al. 1995).

Die Zellkulturversuche von Hussell et al. an Tumorzellen von niedrigmalignen MALT-Lymphomen ermöglichten einen Einblick in die Interaktion der Lymphomzellen: die B-Zellen des MALT-Lymphoms benötigen die Hilfe von nichtneoplastischen T-Lymphozyten. Diese tumorinfiltrierenden T-Zellen reagieren spezifisch mit dem infizierenden *H. pylori*-Stamm und unterstützen in der Folge die Proliferation der Lymphomzellen. Diese Ergebnisse könnten auch die Regression des Lymphoms nach *Helicobacter*eradikation erklären: dem Entzug des bakteriellen Stimulus folgt die Beendigung der T-Zellantwort und konsekutiv die Regression des Lymphoms (Hussell et al. 1993; Hussell et al. 1996). Die tumorinfiltrierenden T-Zellen in MALT-Lymphomen wurden immunhistochemisch näher charakterisiert: Es handelt sich überwiegend um CD4 positive T-Lymphozyten (CD4+ T-Zellen; T<sub>H</sub>-Zellen); auch die proliferierende Fraktion der T-Zellen besteht fast ausschließlich aus CD4+ T-Zellen (Koulis et al. 1997). Weitere Untersuchungen bestätigten eine CD4/CD8-T-Zellratio von 3-4 mittels FACS-Analyse (Knörr et al. 1999; Riedel et al. 2001). Eine mögliche Form der T-Zellhilfe für die MALT-Lymphomzellen konnte von Greiner et al. in vitro vorgestellt werden. Sie demonstrierten, dass die Proliferation niedrigmaligner MALT-Lymphom-B-Zellen in einem CD40-System durch Inkubation mit den T<sub>H</sub>2-Zytokinen Interleukin(IL)-4 bzw. IL-10 deutlich erhöht werden konnte. Die Kombination beider Zytokine wirkte synergistisch auf die B-Zellproliferation. Die Inkubation mit dem T<sub>H</sub>1-Zytokin Interferon- $\gamma$  zeigte keinen Effekt (Greiner et al. 1997). Greiner et al. vermuteten, dass auch in vivo CD40 vermittelte Signale und T<sub>H</sub>2-Zytokine zur Pathogenese der MALT-Lymphome beitragen. Diese These wird durch Untersuchungsergebnisse von Knörr et al. gestützt, die mittels einer semiquantitativen PCR die mRNA-Expression und mittels Immunhistochemie die Proteinexpression von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokinen in elf MALT-Lymphomen bestimmten. Sie fanden ein deutliches Überwiegen der mRNA- und Proteinexpression der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-10 und IL-13 und folgerten, dass ein T<sub>H</sub>2-Profil in vivo über die Unterstützung der Lymphom-B-Zellproliferation zur Progression des MALT-Lymphoms beitragen könnte (Knörr et al. 1999).

Die Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Gene in MALT-Lymphomen weisen somatische Hypermutationen auf, die im Verlauf der Erkrankung fortschreiten können. Dies kann als Effekt einer stattgefundenen Antigenstimulation gedeutet werden und lässt folgern, dass die Expansion der Lymphomzellen antigenabhängig ist. Die somatischen Hypermutationen können nach Eradikation des angenommenen Antigens, *H. pylori*, fortschreiten, so dass mutmaßlich andere Antigene ebenfalls eine Rolle spielen. Da eine höhere Anzahl der V<sub>H</sub>-Gene der MALT-Lymphome denen bekannter Autoantikörper entspricht, könnten Autoantigene an der Unterhaltung der lokalen Proliferation der Lymphom-B-Zellen beteiligt sein (Qin et al. 1995; Du et al. 1996; Thiede et al. 1998).

Die meisten Patienten mit einer *Helicobacter*-Infektion entwickeln kein MALT-Lymphom. Die im Einzelnen verantwortlichen Mechanismen, die den Übergang von der *Helicobacter*-Infektion zum MALT-Lymphom bedingen, sind im Detail noch nicht bekannt. Eine modellhafte Vorstellung der Pathogenese der MALT-Lymphome kann zusammenfassend davon ausgehen, dass eine Vorläufer B-Zelle des malignen Klons in einem entzündlichen Infiltrat durch exogene (*H. pylori*) und/oder endogene Antigenstimulation einen T-Zell-vermittelten Proliferationsvorteil erhält. In der weiteren Folge können dann genetische Alterationen das unkontrollierte Wachstum der Lymphomzellen bestimmen.

### **1.1.5 Klinisches Bild und Stadieneinteilung**

Die Lymphome vom MALT-Typ stellen üblicherweise eine indolente Erkrankung dar und können für lange Zeit lokalisiert bestehen bleiben. Die Symptome sind, soweit vorhanden, Dyspepsie und/oder epigastrische bzw. abdominelle Schmerzen (Zucca et al. 2000).

Die endoskopischen Befunde können stark variieren; sie zeigen überwiegend eine unspezifische Gastritis und/oder Ulzera (Isaacson 1999b; Kolve et al. 1999).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation in der von Musshoff 1977 überarbeiteten Form (Musshoff 1977). 1994 erfolgte auf der Lugano-Konferenz eine weitere Differenzierung dieser Klassifikation (Rohatinger et al. 1994). Die Tabelle 1 zeigt die derzeit angewendete Stadieneinteilung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befindet sich die überwiegende Anzahl der Patienten im

Stadium I<sub>E</sub>, 10-20 % im Stadium II<sub>E</sub> und bei 5-10 % findet sich eine Knochenmarkbeteiligung entsprechend Stadium IV<sub>E</sub> (Isaacson 1999a).

Stadium	Definition
Stadium I <sub>1E</sub>	uni- oder multilokulärer Befall der Magenmukosa und -submukosa ohne Lymphknotenbeteiligung und ohne Organinfiltration per continuitatem
Stadium I <sub>2E</sub>	wie I <sub>1E</sub> , jedoch überschreitet das Lymphom die Submukosa und infiltriert die Muscularis propria bis zur Serosa, aber ohne Organinfiltration per continuitatem
Stadium II <sub>1E</sub>	uni- oder multifokaler Magenbefall jeglicher Infiltrationstiefe einschließlich eines weiteren Organbefalls per continuitatem, zusätzlicher Befall regionärer Lymphknoten (Kompartiment 1-2)
Stadium II <sub>2E</sub>	wie II <sub>1E</sub> , jedoch Befall regionärer und nicht regionärer infradiaphragmatischer Lymphknoten
Stadium III <sub>E</sub>	uni- oder multilokulärer Magenbefall jeglicher Infiltrationstiefe, zusätzlich Befall regionärer und nichtregionärer infra- und supradiaphragmaler Lymphknoten einschließlich eines weiteren lokalisierten Organbefalls im Gastrointestinaltrakt und eines weiteren lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Gewebes (III <sub>E</sub> ) oder der Milz (III <sub>S</sub> )
Stadium IV <sub>E</sub>	uni- oder multilokulärer Befall des Magens mit oder ohne Beteiligung aller zugehörigen Lymphknoten und diffuser oder disseminierter Befall extragastraler Organe (z.B. Knochenmark)

**Tab. 1** Stadieneinteilung gastrointestinaler Lymphome

### 1.1.6 Diagnostik

Der endoskopisch-bioptischen Diagnostik kommt herausragende Bedeutung zu. Dabei sollte grundsätzlich ein „Mapping“ angestrebt werden, das heißt, die Probengewinnung aus makroskopisch auffälligen Bereichen wird durch die Biopsieentnahme aus unauffälligen Bereichen ergänzt (Fischbach 2000). Der *Helicobacter pylori*-Status kann im Rahmen der initialen Gastroskopie mittels des Ureaseschnelltestes und/oder histologisch erhoben werden.

Die Endosonographie gibt Aufschluss über das submuköse Wachstum und ist somit unerlässlich zur Differenzierung der Stadien I<sub>1E</sub> und I<sub>2E</sub> (Sackmann et al. 1997).

Zur Erfassung der Lymphomausbreitung bzw. des Tumorstadiums werden analog zum allgemeinen Vorgehen bei nodalen Lymphomen die zervikale und abdominelle Sonographie, die Computertomographie von Thorax und Abdomen sowie die Knochenmarkpunktion eingesetzt (Fischbach 1999).

### 1.1.7 Therapie und Prognose

Zur Therapie der gastrischen Lymphome stehen prinzipiell chirurgische Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie sowie die Kombination der einzelnen Verfahren zur Verfügung.

Eine weitere Option bietet sich für Patienten mit einem MALT-Lymphom des Stadiums I<sub>IE</sub> an. Sie werden einer *Helicobacter*-eradikation unterzogen, wobei eine komplette Remission in ca. 80 % der Fälle erreicht werden kann. Die endoskopische und/oder histologische Regression erfolgt in der Mehrzahl der Fälle nach ein bis drei Monaten. Es ist noch nicht letztendlich geklärt, ob die *H. pylori*-Eradikation den Patienten tatsächlich dauerhaft von dem MALT-Lymphom befreien kann. Dieser Therapieansatz sollte daher derzeit im Rahmen kontrollierter Studien erfolgen, die eine langfristige Überwachung der Patienten gewährleisten (Neubauer et al. 1997; Fischbach 1999; Zucca et al. 2000, Wündisch et al. 2005).

Bei Misserfolg der Eradikationstherapie im Stadium I<sub>IE</sub> sowie für die Stadien ab II<sub>IE</sub> liegen für die chirurgische Resektion die größten Erfahrungen vor. Je nach Malignitätsgrad, Tumorstadium und Residualtumorstatus kann postoperativ eine Radiotherapie und/oder eine Chemotherapie durchgeführt werden. Eine allgemein etablierte Standardtherapie der Magen-Lymphome gibt es derzeit noch nicht. Als bedeutendste prognostische Faktoren können vor allem der histologische Malignitätsgrad und das Tumorstadium herangezogen werden (Cogliatti et al. 1991; Radaszkiewicz et al. 1992). Die 5-Jahresüberlebensrate wird zwischen 80 und 95 % angegeben (Zucca et al. 2000).

## 1.2 Konzept der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Zellen

### 1.2.1 Einleitung

Das Immunsystem untergliedert sich in einen unspezifischen („natürlichen“ bzw. „angeborenen“) und einen antigenspezifischen („erworbenen“) Anteil.

Die unspezifische Immunabwehr wird vor allem getragen von Komponenten des Komplementsystems, Zytokinen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Phagozyten.

Die antigenspezifische Immunabwehr weist eine humorale (humorale Immunität) und eine zelluläre Komponente (zellvermittelte Immunität) auf. Die Aktivierung

beider Komponenten ist abhängig von CD4+ T-Lymphozyten (T-Helferzellen). Diese erkennen ein Antigen nur, wenn es von antigenpräsentierenden Zellen (APC) phagozytiert, prozessiert und gebunden an MHC-Klasse-II-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) präsentiert wird. Die aktivierten T-Lymphozyten befähigen zum einen B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion (humorale Immunität) zum anderen erhöhen sie die Makrophagenaktivität (zellvermittelte Immunität). Erfolgreiche Immunreaktionen beinhalten überwiegend beide skizzierten Komponenten. Allerdings können sich diese beiden Typen der Immunantwort in bestimmten Situationen auch gegenseitig ausschließen. Die von CD4+ T-Zellen abhängigen Mechanismen, die für diese Dichotomie verantwortlich zeichnen, waren bis in das Jahr 1986 nicht bekannt. In diesem Jahr wiesen Mosmann et al. im Mausmodell die Existenz zweier Subgruppen innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten nach:  $T_H2$ - (humorale Immunität) und  $T_H1$ - (zellvermittelte Immunität) Zellen (Mosmann et al. 1986).

### 1.2.2 Definition

Die Gruppe um Del Prete zeigte 1991, dass es auch humane  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen gibt (Del Prete et al. 1991). Die Unterscheidung der beiden Gruppen erfolgt anhand ihres Zytokinproduktionsprofils. Definitionsgemäß produzieren  $T_H1$ -Zellen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ).  $T_H2$ -Zellen produzieren Interleukin-4 (IL-4), sowie IL-5, IL-9 und IL-13. IL-10 und IL-2 verteilen sich nicht so eindeutig wie die vorgenannten Zytokine auf die beiden Gruppen, überwiegend wird IL-10 von  $T_H2$ - und IL-2 von  $T_H1$ -Zellen produziert (Del Prete 1998). Vorausgegangen war der Nachweis der Existenz von  $T_H0$ -Zellen, die  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zytokine freisetzen (Paliard et al. 1988).

### 1.2.3 Funktionen

$T_H1$ -Zellen fördern die Aktivierung von Makrophagen und die Produktion von opsonisierenden und komplementbindenden Antikörpern. Des Weiteren weisen sie eine zytolytische Aktivität auf (Del Prete 1998).  $T_H1$ -Zellen sind demnach nicht ausschließlich für die zellvermittelte Immunität verantwortlich, sondern, umfassender betrachtet, für Phagozyten-abhängige Immunreaktionen (Romagnani 1999).



T<sub>H</sub>2-Zellen unterstützen die Antikörperproduktion, vor allem von IgE und IgG4. Die mukosale Immunität wird durch die Bildung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für eosinophile Granulozyten und Mastzellen gefördert (Mosmann und Sad 1996). IL-4, IL-10 und IL-13 hemmen unterschiedliche Makrophagenfunktionen. T<sub>H</sub>2-Zellen sind demnach nicht ausschließlich für die humorale Immunität zuständig, sondern, genauer für Phagozyten-unabhängige Immunreaktionen (Romagnani 1999).

#### **1.2.4 T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen als polarisierte Formen der spezifischen**

##### **Immunantwort**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen weisen kein T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zytokinmuster auf. Sie produzieren überwiegend IL-2 und differenzieren erst nach Antigenkontakt in die unterschiedliche Zytokine produzierenden Phänotypen. Entsprechend können T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen von einer gemeinsamen Vorläufer-T<sub>H</sub>-Zelle abstammen (Mosmann und Sad 1996). T<sub>H</sub>0-Zellen repräsentieren wahrscheinlich eine heterogene Gruppe von teilweise differenzierten T-Zellen (Romagnani 1999), wobei noch nicht endgültig geklärt ist, ob die T<sub>H</sub>0-Zellen eine obligate Zwischenstufe auf dem Weg der Differenzierung darstellen. Allerdings erhöht sich der Ausprägungsgrad der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung mit der Chronizität einer Immunantwort. So zeigen sich gemischte (T<sub>H</sub>0-)Zytokinmuster vor allem früh nach der Lymphozytenaktivierung und die prägnantesten Darstellungen der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Dichotomie gelingen in chronischen Erkrankungsstadien (Abbas et al. 1996). T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen können demzufolge als polarisierte Formen der spezifischen Immunantwort angesehen werden, die unter dem Einfluss genetischer- sowie Umweltfaktoren entstehen (Del Prete 1998).

#### **1.2.5 Mechanismen der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung**

Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf die Entwicklung der T<sub>H</sub>-Vorläuferzelle zur polarisierten T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellpopulation (Constant und Bottomly 1997).

##### **1.2.5.1 Zytokine als Faktoren der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung**

Die potentesten und relevantesten Induktoren der T-Zellpolarisierung sind bestimmte Zytokine selbst.

Die T<sub>H</sub>1-Zellentwicklung wird entscheidend von IL-12 induziert. Dies konnte mit Hilfe von in vitro Studien an T-Zell-Rezeptor (TCR) transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Seder et al. 1993; Hsieh et al. 1993) und auch an humanen T<sub>H</sub>-Zellklonen gezeigt werden (Manetti et al. 1994). IL-12 wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen freigesetzt. Die Produktion von IL-12 kann induziert werden durch Endotoxine, Komponenten von Viren, intrazellulären Bakterien und Protozoen (Abbas et al. 1996). IFN- $\gamma$  ist das Zweite, weniger relevante, Zytokin, das die Entstehung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort begünstigen kann, da es a) die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen hemmen kann (Maggi et al. 1992), b) die IL-12-Sekretion von Makrophagen erhöhen kann (Trinchieri 1995) und c) die T-Zellen empfindlicher auf IL-12 reagieren lässt (Abbas et al. 1996). IFN- $\gamma$  kann u. a. von NK-Zellen freigesetzt werden (Paul und Seder 1994).

Die T<sub>H</sub>2-Zellentwicklung wird durch IL-4 induziert. Diese Wirkung von IL-4 ist im murinen (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990) wie im humanen Modell (Maggi et al. 1992) belegt. Auch Strategien, die die IL-4 Wirkung antagonisieren, wie die Verwendung von anti-IL-4-Antikörpern im Mausmodell der *Leishmania major*-Infektion, demonstrieren indirekt die Bedeutung von IL-4 für die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort (Sadick et al. 1990). Darüber hinaus kann IL-4 die Entwicklung von T<sub>H</sub>1-Zellen blockieren (Seder et al. 1992). Die Quelle der frühen IL-4 Produktion ist bisher nicht sicher bekannt. Es könnte die naive T-Zelle selbst sein, die im murinen Modell, auch unabhängig von IL-4, IL-4 produzieren kann (Schmitz et al. 1994). Am Ort der T-Zellantwort könnte sich mit verstärkter Lymphozytenaktivierung auch die IL-4 Produktion erhöhen. Sobald die Menge an IL-4 einen Schwellenwert überschritten hat, könnte dann der T<sub>H</sub>2-Phänotyp ausgebildet werden (Abbas et al. 1996; Romagnani 1999). Als primäre Produzenten von IL-4 sind theoretisch auch basophile Granulozyten und Mastzellen denkbar, allerdings wird diese Möglichkeit für unwahrscheinlicher gehalten (Del Prete 1998, Paul and Seder 1994).

#### **1.2.5.2 Weitere Faktoren der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung**

Im Rahmen der Differenzierung der T-Zellen spielen unter anderem die Dosis des Antigens, das Ausmaß der TCR-Ligation sowie die APC und ihre kostimulierenden Moleküle eine Rolle. Diesen Faktoren wird ein geringer Einfluss auf die Art der

Polarisierung zugeschrieben, auch sind die Mechanismen im Einzelnen bisher nur unzureichend verstanden (O`Garra et al. 2000).

### **1.2.6 Transkriptionsfaktoren in der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2- Polarisation**

IL-12 vermittelt seine Wirkung über den IL-12 Rezeptor. Es aktiviert STAT3 (engl.: „signal transducers and activators of transcription“) und STAT4 (Jacobson et al. 1995). Mäuse mit defizientem IL-12- (Magrath et al. 1996) oder STAT4-Gen (Kaplan et al. 1996b; Thierfelder et al. 1996) zeigen deutlich verringerte T<sub>H</sub>1-Antworten. Der Transkriptionsfaktor T-bet (engl.: „T-box expressed in T cells“) ist für die Entwicklung einer T<sub>H</sub>1-Antwort ebenfalls relevant: T-bet wird nur in T<sub>H</sub>1-, nicht in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert. In T-bet defizienten Mäusen zeigt sich eine supprimierte IFN- $\gamma$ -Produktion und retrovirale Infektion von T-Zellen mit T-bet führt zu supprimierter Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen sowie gesteigerter Produktion von IFN- $\gamma$  (Neurath et al. 2002).

IL-4 wirkt über die Bindung an den IL-4 Rezeptor. Es übermittelt Signale über die Aktivierung von STAT6 (Hou et al. 1994; Quelle et al. 1995). Mäuse mit defizientem IL-4- (Kopf et al. 1993) oder STAT6 -Gen (Shimoda et al. 1996; Takeda et al. 1996; Kaplan et al. 1996a) zeigen defiziente bzw. keine Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen. Über den IL-4/STAT6-Signalweg erfolgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-3 (Kurata et al. 1999). GATA-3 ist selektiv in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert, nicht aber in T<sub>H</sub>1-Zellen (Zheng et al. 1997) und bewirkt die Expression von IL-4 und IL-5 (Neurath et al. 2002). Da GATA-3 sogar in STAT6-defizienten T-Zellen eine T<sub>H</sub>2-Entwicklung bedingen kann und sich von STAT6 unabhängig autoaktivieren kann, wird er als der wesentliche Transkriptionsfaktor in der T<sub>H</sub>2-Zellentwicklung angesehen (Ouyang et al. 2000).

C-maf ist neben GATA-3 der zweite spezifische Transkriptionsfaktor in T<sub>H</sub>2-Zellen (d.h. keine Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen). Seine Expression kann über den TCR induziert werden; er wirkt aktivierend auf den IL-4 Promoter. C-maf defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte IL-4 Produktion (Kim et al. 1999; Ho et al. 1996). Weitere Transkriptionsfaktoren sind in die T<sub>H</sub>2-Zelldifferenzierung involviert, z.B. NFATc2 und Jun-b, ihnen wird bisher keine wesentliche Rolle in der T<sub>H</sub>2-Zellentwicklung zugesprochen (O`Garra et al. 2000).

Überproduktion oder funktionelle Veränderungen der relevanten Transkriptionsfaktoren t-bet und GATA-3, z.B. auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition, könnten eine Rolle bei der Entwicklung von polarisierten T<sub>H</sub>-Zellantworten und assoziierten Erkrankungen spielen.

### **1.2.7 Physiologische und pathologische Konsequenzen der T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Polarisierung**

Polarisierte T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Immunantworten können protektiv wirken, aber auch pathologische Immunreaktionen fördern.

#### **1.2.7.1 Infektionen**

Die Leishmaniose im Mausmodell zeigte zuerst die Relevanz des T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Paradigma in Infektionserkrankungen. In der C57BL/6 Maus entsteht infolge einer Infektion mit *Leishmania major* (*L. major*) eine T<sub>H</sub>1-Antwort, die protektiv wirkt, wohingegen in der BALB/c Maus die Progression der *Leishmania*-Infektion mit einer T<sub>H</sub>2-Antwort einhergeht. Die mit einer T<sub>H</sub>2-Antwort reagierende BALB/c Maus ist demnach als „empfindliche“, die mit einer T<sub>H</sub>1-Antwort reagierende C57BL/6 Maus als „resistente“ Maus einzuschätzen (Reiner und Locksley 1995). Die Infektion des Menschen mit *L. major* zeigt korrelierend in der chronischen, destruktiven mukokutanen Form eine höhere IL-4 Expression als in der lokalisierten kutanen Form (Pirmez et al. 1993).

Gegen viele intrazelluläre Erreger, gegen Protozoen und Pilze wirken T<sub>H</sub>1-Immunreaktionen protektiv (Abbas et al. 1996). Diese antimikrobielle, inflammatorische T<sub>H</sub>1-Antwort kann zu Gewebeschäden führen. Ein Beispiel für eine T<sub>H</sub>1-vermittelte Infektion ist die *H. pylori*-Gastritis (Lohoff et al. 2000).

Gegen extrazelluläre Pathogene, besonders Helminthen, wirken T<sub>H</sub>2-Immunantworten protektiv; potentiell schädliche T<sub>H</sub>1-Antworten können vermindert werden (Del Prete 1998; Mowen und Glimcher 2004).

#### **1.2.7.2 Erkrankungen des atopischen Formenkreises**

Allergien und Asthma sind mit T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantworten assoziiert. Dieses Konzept basiert auf aussagekräftigen experimentellen Daten, die sowohl im Tiermodell als auch im menschlichen Organismus erhoben werden konnten

(Romagnani 2000). Im Bereich der atopischen Allergien zeigen sich bereits erfolgreiche Ansätze der Behandlung  $T_H2$ -vermittelter Erkrankungen: eine erfolgreiche spezifische Immuntherapie kann die allergen-spezifische Immunreaktion vom  $T_H2$ -Typ zum  $T_H1$ -Typ verschieben (Jutel et al. 1995; Secrist et al. 1993).

### **1.2.7.3 Spektrum weiterer $T_H1$ -/ $T_H2$ -assoziierter Erkrankungen**

Als  $T_H1$ -assozierte Erkrankungen werden angesehen: Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Hashimoto-Thyreoiditis, Rheumatoide Arthritis, akute Transplantat-abstoßung.

$T_H2$ -Antworten zeigen sich in folgenden pathologischen Prozessen: Progress der HIV-Infektion zu AIDS, Tumorprogression, systemische Sklerodermie, systemischer Lupus erythematosus (Romagnani 1999; Del Prete 1998).

## **1.3 IL-4 Rezeptor**

### **1.3.1 Struktur und Funktion des IL-4 Rezeptors**

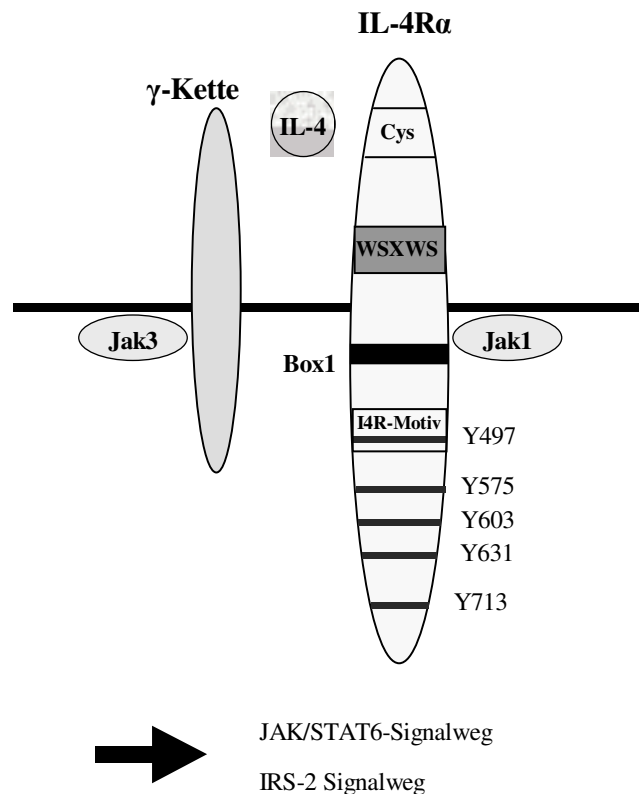
IL-4 zeigt pleiotrope Wirkungen: es stimuliert die Proliferation sowie die Differenzierung von B-Lymphozyten und ist unerlässlich für die IgG4-beziehungsweise IgE Sekretion. Es induziert die Expression der MHC-Klasse-II Moleküle wie auch die des Fc-RezeptorsII für IgE (CD23) (Paul 1991). Im T-Zellkompartiment wirkt IL-4, wie bereits ausgeführt, in entscheidender Weise als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für  $T_H2$ -Zellen.

Die vielfältigen Wirkungen von IL-4 werden über den IL-4 Rezeptor (IL-4R) vermittelt, der als Typ I IL-4R auf hämatopoetischen Zellen und als Typ II IL-4R auf epithelialen und endothelialen Zellen vorkommt (Mowen und Glimcher 2004). Der Typ I IL-4R besteht aus der IL-4R $\alpha$ -Kette (IL-4R $\alpha$  bzw. CD124) und der  $\gamma$ -Kette (CD132); der Typ II IL-4R besteht aus dem IL-4R $\alpha$  und einer Komponente des IL-13 Rezeptors (IL-13R $\alpha$ ) (Chomarat und Banchereau 1997; Hilton et al. 1996).

Der IL-4R $\alpha$  ist die hochaffine Bindungsstelle für IL-4. Er ist ein aus 800 Aminosäuren bestehendes transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 140 kD. Die extrazelluläre Domäne von 207 Aminosäuren weist die zwei charakteristischen Motive der Hämatopoetinrezeptor-Superfamilie auf: konservierte Cysteinreste und das WSXWS Motiv. Die transmembrane Region

besteht aus 24, die intrazelluläre aus 569 Aminosäuren (Idzerda et al. 1990). Die intrazelluläre Region enthält proximal, membrannah, das prolin-reiche Box1-Motiv, das auch in anderen Rezeptoren der Hämatopoetinrezeptor – Superfamilie gefunden wurde, sowie fünf konservierte Tyrosinreste (Y497, Y575, Y603, Y631, Y713) (Nelms et al. 1999). Die 64 kD schwere  $\gamma$ -Kette ist auch Bestandteil von anderen Zytokinrezeptoren; so von IL-2, IL-7, IL-9 und

IL-15 (Sugamura et al. 1995). Sie kann die Ligandenbindung und nachfolgende Signaltransduktion unterstützen (Kondo et al. 1993; Russell et al. 1993). Die Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Typ I IL-4 Rezeptors.



**Abb. 1** Typ I IL-4 Rezeptor (modifiziert nach Nelms et al. 1999)

### 1.3.2 Signaltransduktion über den IL-4 Rezeptor

Die Bindung von IL-4 an die IL-4R $\alpha$ -Kette führt zur Heterodimerisation des Rezeptors und initiiert damit die Aktivierung nachfolgender IL-4R-Signalwege. Der IL-4R $\alpha$  verfügt wie seine assoziierten Rezeptormoleküle  $\gamma$ -Kette und IL-13R $\alpha$  nicht über eine endogene Tyrosinkinaseaktivität; daher benötigt er assoziierte Kinasen zur Signalweiterleitung. Die über Januskinasen (JAK) vermittelte Signaltransduktion ist ein wichtiger durch Zytokine induzierter Signaltransduktionsweg von der Zelloberfläche zum Zellkern. IL-4-Ligation an den IL-4R aktiviert JAK1 und JAK3. JAK3 soll vornehmlich mit der  $\gamma$ -Kette assoziieren (Nelms et al. 1999). Die Aktivierung von JAK1 führt zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der

zytoplasmatischen Region des IL-4R $\alpha$  und nachfolgend zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT6 (Chen et al. 1997; Nelms et al. 1999; Gessner und Röllinghoff 2000). Die konservierten Tyrosinreste Y575, Y603 und Y631 scheinen für die STAT6 Interaktion mit dem IL-4R $\alpha$  von Bedeutung zu sein (Nelms et al 1999; Ryan et al 1996; Hou et al 1994). STAT6 dimerisiert, transloziert in den Zellkern und aktiviert unter anderem die Expression von IL-4 und GATA-3. Die wesentliche Bedeutung von STAT6 für die Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen konnte, wie unter 1.2.6 erläutert, auch überzeugend an STAT6 defizienten Mäusen gezeigt werden. Der IL-4R/STAT6 Signalweg wirkt als positiver Feedback-Mechanismus für die T<sub>H</sub>2-Zellentwicklung (Mowen und Glimcher 2004).

Der zweite über den IL-4R aktivierte Signaltransduktionsweg involviert Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) Moleküle. Das Insulin IL-4 Rezeptor (I4R) Motiv im IL-4R $\alpha$ , das den Tyrosinrest Y497 enthält, ist notwendig für die Aktivierung von IRS-Molekülen (Keegan et al. 1994). IRS-2 defiziente T<sub>H</sub>-Zellen zeigen eine verringerte Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen (Wurster et al. 2002).

Zusammenfassend kontrollieren die Signalwege, die über den IL-4R vermittelt werden, die Aktivierung der zentralen T<sub>H</sub>2-Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 (über STAT6).

Konsistent hierzu weisen IL-4R $\alpha$  defiziente BALB/c-Mäuse verringerte IL-4 vermittelte Funktionen auf und können interessanterweise eine Infektion mit *L. major* (IR 173) kontrollieren (Urban et al. 1998; Mohrs et al. 1999; Noben-Trauth et al. 1999).

Strukturelle Veränderungen des IL-4R $\alpha$ , z.B. bedingt durch Polymorphismen, könnten die Signalvermittlung über den Rezeptor alterieren (Nelms et al. 1999).

### **1.3.3 IL-4R $\alpha$ Polymorphismen**

#### **1.3.3.1 Definition**

Eine Auflistung der bisher bekannten Polymorphismen, die zu einem Aminosäureaustausch im IL-4R $\alpha$  führen, findet sich in Tabelle 2.

Polymorphismus	BP	WT	MT	AS	WT/AS	MT/AS
I50V	148	<u>A</u> TC	<u>G</u> TC	50	Ile	Val
E375A	1124	<u>G</u> AG	<u>G</u> CG	375	Glu	Ala
C406R	1216	<u>T</u> GC	<u>C</u> GC	406	Cys	Arg
S411L	1232	<u>T</u> CG	<u>T</u> TG	411	Ser	Leu
S478P	1432	<u>T</u> CC	<u>C</u> CC	478	Ser	Pro
Q551R	1652	<u>C</u> AG	<u>C</u> GG	551	Gln	Arg
S761P	2281	<u>T</u> CA	<u>C</u> CA	761	Ser	Pro

**Tab. 2.** IL-4R $\alpha$  Polymorphismen, BP: polymorphe Basenpaarposition (relativ zum Startkodon des reifen Proteins), WT: Sequenz des Wildtyps, MT: mutierte Sequenz, AS: Aminosäureposition, WT/AS: Aminosäure des Wildtyps, MT/AS: Aminosäure des mutierten Typs

Das für den humanen IL-4R $\alpha$  kodierende Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p12.1). 1997 wurden erstmals zwölf Polymorphismen im IL-4R $\alpha$  Gen beschrieben. Fünf dieser Punktmutationen führen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des IL-4R $\alpha$ : I50V, E375A, C406R, S411L und S761P (Deichmann et al. 1997). Später wurden die Polymorphismen Q551R und S478P beschrieben, die ebenfalls jeweils den Austausch einer Aminosäure bedingen, was letztlich Voraussetzung für funktionelle Veränderungen im IL-4R $\alpha$  ist (Hershey et al. 1997; Kruse et al. 1999). Der I50V-Polymorphismus liegt extrazellulär, die anderen Polymorphismen intrazellulär nahe den konservierten Tyrosinresten. In der Mehrzahl der Publikationen wird abweichend von der Tabelle 2 in Bezug auf den I50V-Polymorphismus Isoleucin (Ile) als die mutierte Aminosäure angesehen.

### 1.3.3.2 Assoziation der IL-4R $\alpha$ Polymorphismen mit bestimmten Erkrankungen

Der erste beschriebene IL-4R $\alpha$  Allotyp wurde in der BALB/c Maus entdeckt. Sie trägt im Gegensatz zur C57BL/6 Maus acht veränderte Aminosäuren in ihrem IL-4R $\alpha$ . Drei Substitutionen liegen extrazellulär, fünf intrazellulär. Schulte et. al diskutierten anhand von funktionellen Analysen an murinen IL-4R Allotypen, dass das Vorhandensein des IL-4R $\alpha$  Allotyps in der BALB/c Maus die beobachtete IL-4 Hyperreaktivität (siehe 1.2.7.1) dieser Maus bedingt und damit Ursache der im murinen *Leishmaniose*-Modell beobachteten pathologischen T<sub>H</sub>2-Antwort der BALB/c Maus sein könnte (Schulte et al. 1997).

Es existieren viele Publikationen, die sich mit der Frage beschäftigen, ob die bekannten Polymorphismen des humanen IL-4R $\alpha$  mit bestimmten Erkrankungen



assoziiert sind. Das besondere Interesse gilt hierbei den sicher als T<sub>H</sub>2-vermittelt angesehen Erkrankungen des atopischen Formenkreises.

Hershey et al. zeigten 1997 erstmals eine Assoziation des Q551R Polymorphismus mit dem Hyper-IgE-Syndrom, der schweren atopischen Dermatitis und der Atopie (definiert über erhöhtes IgE oder Existenz von IgE Antikörpern gegen bestimmte verbreitete Allergene). Nach Stimulation mit IL-4 konnte eine erhöhte Expression von CD23 auf peripheren mononukleären Blutzellen von Trägern des mutierten Allels demonstriert werden. Dieses Ergebnis sowie der Nachweis verringerter Bindung von SHP-1 (eine Phosphatase, die die Zytokinrezeptor-Signalkaskade negativ regulatorisch beeinflussen kann) an synthetische Phosphopeptide, die die Q551R-Mutation des IL-4R $\alpha$  repräsentierten, ließ die Autoren schlussfolgern, dass der Q551R Polymorphismus die Signaltransduktion über den IL-4R $\alpha$  im Sinne einer „gain of function“-Mutation steigert (Hershey et al. 1997). Die Assoziation der atopischen Dermatitis mit der Q551R-Variante konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden (Oiso et al. 2000). In einer japanischen Population konnte für den I50V Polymorphismus ebenfalls eine Assoziation mit atopischem Asthma und erhöhten IgE-Serumkonzentrationen gefunden werden (Mitsuyasu et al. 1998). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte mit Hilfe von transfizierten B-Zelllinien, dass die Substitution von Valin durch Isoleucin (Polymorphismus I50V) eine erhöhte Signaltransduktion (gesteigerte STAT6 Aktivierung und vermehrte Transkriptionsaktivität des IgE-Promoters) über den IL-4R $\alpha$  zur Folge hat und, dass periphere mononukleäre Blutzellen von homozygoten Isoleucin-Trägern nach Stimulation mit IL-4 eine leicht erhöhte CD23-Expression aufweisen (Mitsuyasu et al. 1998/1999). Takabayashi et al. belegten ebenfalls eine Assoziation zwischen dem I50-Allel und Asthma (Takabayashi et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Ober zeigte für Kombinationen von jeweils zwei Polymorphismen (I50V, E375A, C406R bzw. S478P) eine Assoziation zu Atopie und Asthma auf (Ober et al. 2000).

Die mutmaßliche Assoziation zwischen atopischen Erkrankungen und IL-4R $\alpha$  Polymorphismen konnte nicht in allen Studien nachvollzogen werden. So zeigten Kruse et al. für die Varianten Q551R und S478P eine Assoziation mit verringerten Gesamt-IgE Konzentrationen (Kruse et al. 1999). Zwei weitere Studien konnten die Assoziation zwischen der Q551R-Variante und dem Hyper-IgE-Syndrom bzw. die

Assoziation zwischen dem Polymorphismus I50V und Atopie/Asthma nicht nachweisen (Grimbacher et al. 1998; Noguchi et al. 1998).

Eine Studie aus dem Jahr 1999 zeigte in einer japanischen Patientengruppe eine Assoziation des T<sub>H</sub>2-vermittelten Lupus erythematosus mit den IL-4R $\alpha$ -Varianten I50V und Q551R. Die Autoren diskutierten ebenfalls, dass die IL-4R $\alpha$  Polymorphismen die Entstehung eines Lupus erythematosus über die Induktion einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigen könnten (Kanemitsu et al. 1999).

Die IL-4R $\alpha$  Polymorphismen können die Signaltransduktion über den IL-4R $\alpha$  beeinflussen. Die Studienergebnisse sind uneinheitlich; allerdings gibt es Anhalt dafür, dass es sich zumindest teilweise um „gain of function“-Mutationen mit einer gesteigerten Signaltransduktion über den IL-4 Rezeptor handelt, wodurch die Entstehung einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt werden könnte.

#### **1.4 Fragestellung**

Die Proliferation der MALT-Lymphom-B-Zellen ist antigenabhängig (*H. pylori*, evtl. weitere Autoantigene). Die Vermittlung des Antigenstimulus an die B-Zellen erfolgt über tumorinfiltrierende T-Helferzellen. Es stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus die tumorinfiltrierenden T-Zellen den B-Zellen des MALT-Lymphoms den Wachstumsvorteil vermitteln. Die Stimulation der B-Zellen zur Proliferation über Zytokinvermittlung ist wahrscheinlich. In Anbetracht der Studien von Greiner et al. und Knörr et al. (siehe 1.1.4) sowie dem Wissen, dass T<sub>H</sub>2-Zytokine zu B-Zellproliferation und -differenzierung beitragen, kann vermutet werden, dass von den tumorinfiltrierenden MALT-Lymphomzellen ein T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil produziert wird. In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen von Relevanz, die an BALB/c-Mäusen, die zu einer hohen T<sub>H</sub>2-Zytokinproduktion und B-Zellantwort neigen, durchgeführt wurden. Eine Infektion dieser Mäuse mit *Helicobacter felis* (hohe Ähnlichkeit zu *H. pylori*) führt zur Entwicklung von MALT-Lymphom-ähnlichen Läsionen (Enno et al. 1995). Diese Beobachtung lässt ebenfalls die These zu, dass eine zum T<sub>H</sub>2-Profil hin verschobene T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Balance die Entstehung von MALT-Lymphomen begünstigen könnte. Die T<sub>H</sub>2-vermittelten Erkrankungen des atopischen Formenkreises sind wahrscheinlich mit IL-4Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen assoziiert. Die IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen könnten in Anbetracht dieser Assoziation

sowie der skizzierten Versuchsergebnisse von Hershey und Mitsuyasu (siehe 1.3.3.2) und der prinzipiellen Tatsache, dass IL-4 seine Wirkung (u. a. die T<sub>H</sub>2-Zellantwort induzierende) über diesen Rezeptor entfaltet, begünstigend auf die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort wirken. Unter diesem Aspekt wurden DNA-Proben von 99 MALT-Lymphompatienten und 120 Kontrollpersonen mittels einer allelspezifischen PCR auf das Vorhandensein der sieben IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen untersucht.

Bisher gibt es nur wenige Daten zur Expression von Interleukinprofilen in MALT-Lymphomen. Auch aus diesem Grund ist die Frage, ob die Lymphome vom MALT-Typ zu den T<sub>H</sub>2-vermittelten Erkrankungen gehören, noch nicht ausreichend beantwortet. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die mRNA-Expression der Markerzytokine der T<sub>H</sub>-Immunantwort, IL-4 und Interferon- $\gamma$ , in 15 MALT-Lymphomen im Vergleich zu 15 *Helicobacter pylori*- Gastritiden mittels einer Real-Time-PCR untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Herstellerfirma
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Hercules
Agar	Sigma
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio Rad
Ampicillin	Sigma
Aqua dest.	Merck, Braun
Bromphenolblau-Xylencyanol	Fluka
Chloroform	Roth
Dextran (MW 500.000)	Sigma
Dextranblau	Fluka
DNTPs (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)	Gibco
123bp-DNA ladder	Gibco BRL
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL
Ethanol absolut	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Formamid	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Nusieve Agarose	Biozym
Kaliumchlorid	Merck
PBS–Dulbecco	Biochrom
Phenol	Gibco BRL
random Hexamer pd (N <sub>6</sub> )	Pharmacia
RNAasin	Promega
RNAzol	PegLab
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia Biotech AB
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ICN
Tetraethylenmethyldiamin (TEMED)	Bio Rad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck
Tris-hydrochlorid	Roth
Trypton	Sigma
Urea	Sigma
X-Gal	ICN
Yeast-Extrakt	Sigma

### 2.1.2 Enzyme

Enzym	Herstellerfirma
Ampli Taq® Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems
Ampli Taq® DNA Polymerase	Applied Biosystems
Proteinase K	Gibco BRL
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	MBI Fermentas
SuperScript™ Reverse Transkriptase	Gibco BRL
AmpErase® Uracil-N-Glycosylase	Applied Biosystems

### 2.1.3 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
GENECLEAN® Spin Kit	BIO 101 Inc.
TaqMan®1000 Reaction PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems
TOPO™TA Cloning Kit (mit pCR2.1 Vector)	Invitrogen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosemischung	Agarose:Agarose Nusieve (1:1)
Buffer 0+ (MBI Fermentas)	50 mM Tris-HCL, (pH7.5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl und 0,1 mg/ml BSA
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	1 g Ethidiumbromid, ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
Ladepuffer (Applied Biosystems)	25 mM EDTA, 50 mg/ml Dextranblau
Gelladepuffer	500 µl Bromphenolblau/Xylencyanol, 4 g Sucrose ad 10 ml dH <sub>2</sub> O
Luria-Bertani-Flüssigmedium	5 g Bacto-Trypton, 2,5 g Yeast-Extrakt, 5 g NaCl, ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
Luria-Bertani-Festmedium	5 g Bacto-Trypton, 2,5 g Yeast-Extrakt, 5 g NaCl und 3,75 g Agar, ad 250 ml dH <sub>2</sub> O
Lyse-Puffer, 1x	8,02 g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogencarbonat, 0,037 g EDTA ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
SOC-Medium	2 %Trypton, 0,5 % Yeast-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCL <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose
TaqMan PCR Buffer A (Applied Biosystems)	500 mM KCL, 100 mM Tris-HCL, 0,1 M EDTA, 600 nM passive Referenz 1, pH8,3
Gene Amp® 10x PCR-Buffer (Applied Biosystems)	100 mM Tris-HCL (pH8,3), 500 mM KCL, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01 % (w/v) Gelatine
Gene Amp 10x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)	150 mM Tris-HCL (pH8), 500 mM KCL, 25 mM MgCl <sub>2</sub>
TBE-Puffer 10x (Gibco)	1 M Tris, 0,9 M Boric Acid, 0,01 M EDTA, pH 8,4±0,1
TBS-Puffer, 10x	44,4 g TrisHCL, 26,5 g TrisOH, 80,69 NaCl, 2 g KCl, ad 1000ml dH <sub>2</sub> O
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50x	0,04 M TrisAcetat, 0,0001 M EDTA, pH 8,3±0,1

### 2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma „TIB MOLBIOL“ (Berlin) bezogen.

Polymorphismus	Primername	Oligonucleotidsequenz 5'-3'	Bp
I50V	I50V5'1	CTG CAG AGC CCA CAC GTG TA	150
	I50V5'2	TGC AGA GCC CAC ACG TGT G	149
	I50V3'	CTG GGC TTG AAG GAG CCC TTC	
E375A	E375A5'1	ACT TCC AGG AGG GAA GGG A	176
	E375A5'2	ACT TCC AGG AGG GAA GGG C	
	E375A3'	CCC TGC ACT TGG GAA CTC AT	
C406R	C406R5'1	CAG GAC ATG GGG GAG TCA T	177
	C406R5'2	AGG ACA TGG GGG AGT CAC	
	C406R3'	AGT CAG GTT GTC TGG ACT CTG	
S411L	S411L5'	CGA TGT GTG GAG TTG TTT GAG	248
	S411L3'1	TGA GCA CTC GTA CTT CCC G	
	S411L3'2	TGA GCA CTC GTA CTT CCC A	
S478P	S478P5'1	TTA CCG CAG CTT CAG CAA CT	163
	S478P5'2	TAC CGC AGC TTC AGC AAC C	162
	S478P3'	CCA GGT TCC TGG CTC AGG TT	
Q551R	Q551R5'	AGC TCT CTG AGC CAA CCA C	143
	Q551R3'1	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CT	
	Q551R3'2	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CC	
S761P	S761P5'	TGC TGT GGA GAC AGG TCC T	139
	S761P3'1	ATG AGG ATT TAC TCT TCT CTG A	
	S761P3'2	ATG AGG ATT TAC TCT TCT CTG G	

**Tab. 3** Primer der allelspezifischen IL-4R $\alpha$  Polymorphismen-PCRs. Bp: Basenpaarlänge des PCR-Produktes

Polymorphismus	Primername	Oligonucleotidsequenz 5'-3'	Bp
I50V	I50Vseq 5'	ATG TCC CGG ACA CAG CTG T	277
	I50Vseq3'	AGG CAG CTG TGG GAA CAC A	
E375A/C406R/ S411L	234seq5'	AGG GAG CTT CTG TGC ATC G	268
	234seq3'	ACT TGG CTC CAG GTG GAG A	
S478P	S478Pseq5'	CTG ACT TGC ACA GAG ACG C	150
	S478Pseq3'	GGG CAT CTC GGG TTC TAC T	
Q551R	Q551R5'	AGC TCT CTG AGC CAA CCA C	252
	Q551Rseq3'	TCT CTG GGG ACA CAG CAC T	
S761P	S761P5'	TGC TGT GGA GAC AGG TCC T	291
	S761Pseq3'	TGG ATA AGC CCT AGT CCT CA	

**Tab. 4** Primer für die IL-4R $\alpha$  Polymorphismen-PCR, die die-PCR-Produkte für die Klonierung lieferte. Bp: Basenpaarlänge des PCR-Produktes

Polymorphismus	Primername	Oligonucleotidsequenz 5'-3'	BP
C406R/S411L	406/411pos5'	CAG AGA GCA TCA GCG TGG	450
	406/411pos3'	AGT TGC TGA AGC TGC GG	
S478P	S478Pseq5'	CTG ACT TGC ACA GAG ACG C	238
	S478Ppos3'	GCT GGA GGA CAT TTC GG	

**Tab. 5** Primer für die Erstellung der Positiv/Negativ-Kontrollen der IL-4R $\alpha$  Polymorphismen-PCRs (sofern abweichend von Primern der Tab.4). Bp: Basenpaarlänge des PCR-Produktes.

Gen	Primer-name	Oligonucleotidsequenz 5'-3'	BP
IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ for	CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA	72
	IFN $\gamma$ rev	CGC TTC CCT GTT TTA GCT GC	
	IFN- $\gamma$ TM	6FAM-TCC AAG TGA TGG CTG AAC TGT CGC C XT p	
IL-4	IL-4for	CCC CCT CTG TTC TTC CTG CT	192
	IL-4rev	AGC CCT GCA GAA GGT TTC CT	
	Il-4 TM	6FAM-TGC CGG CAA CTT TGT CCA CGG XT p	
GAPDH	GAPDHfor	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	226
	GAPDHrev	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	
	GAPDHTM	5TAMRA-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC X*T p	

**Tab. 6** Primer für die TaqMan-PCR. X: TAMRA, X\*: FAM

Primername	Oligonucleotidsequenz 5'-3'
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

**Tab. 7** Primer für die Sequenzierungsreaktion

## 2.1.6 Großgeräte und sonstige Materialien

Großgeräte/Materialien	Hersteller
ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems
ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzer	Applied Biosystems
Bromax MR Kodak 6.06 (Polaroidfilme)	Kodak
Edos 5222	Kobe
Eppendorf-Röhrchen (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Edos Pipettenaufsätze	Eppendorf
Gene Amp PCR-System 9600	Perkin Elmer
Handhomogenisator (Röhreu. Pistille)	Kobe
Kimwipes Präzisionstücher	Kobe
Micro Amp (optical) caps	Applied Biosystems
Micro Amp (optical) tubes	Applied Biosystems
Micro Amp (optical) 96 well reaction plates	Applied Biosystems
Polaroid MP-4 LAND Camera	Bachhofer
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen (aerosolresistent)	Greiner
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	Amersham Pharmacia Biotech
Thermocycler PE 9600	Perkin Elmer
UV-durchlässiger Gelträger	Gibco

## 2.2 IL-4 Rezeptor $\alpha$ Polymorphismen

### 2.2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Für die Arbeit wurden 99 Patienten mit MALT-Lymphomen untersucht. Unter den Patienten waren 52 Frauen und 47 Männer. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 62 Jahren (29-88 Jahre). Die Patienten wurden im Rahmen einer deutschlandweiten prospektiven Multicenterstudie der Studiengruppen von Prof. Bayerdörffer, Prof. Stolte und Prof. Neubauer betreut. Das Ziel der Studie war die Klärung der Bedeutung der *Helicobacter*eradikation bei frühen niedrigmalignen Magen-Lymphomen vom MALT-Typ (Bayerdörffer et al. 1995). Der Referenzpathologe Professor Stolte („Institut für Pathologie“ des Klinikums Bayreuth) stellte die Diagnose eines frühen niedrigmalignen Magenlymphoms vom MALT-Typ. Das Tumorstaging erfolgte mittels klinischer Untersuchung, Endosonographie, Computertomographie von Abdomen und Thorax sowie einer Knochenmarkpunktion. Bei Vorliegen eines Stadiums I<sub>IE</sub> erfolgte nach Einwilligung des Patienten und des behandelnden Arztes die Aufnahme in die Studie. Es erfolgte eine erneute Gastroskopie mit Biopsieentnahme für Histologie, Mikrobiologie und molekularbiologische Untersuchung. Anschließend wurde die Therapie eingeleitet. Diese bestand in der Gabe von dreimal 750 mg Amoxicillin täglich und dreimal 40 mg Omeprazol täglich über zwei Wochen. Bis eine Regression des Lymphoms eintrat, erfolgte alle vier Wochen eine Kontrollgastroskopie. Wurde eine komplette Regression erreicht, wurden die Kontrollgastroskopien alle 6 Monate durchgeführt. Patienten, die bei der zweiten Nachkontrolle kein Ansprechen zeigten, wurde ein alternatives Therapieverfahren empfohlen. Das gleiche galt für Patienten, die 22 Wochen nach Therapieende keine komplette Regression erlangten.

120 erwachsene Personen dienten als Kontrollgruppe: die DNA dieser Personen wurde uns anonymisiert freundlicherweise von Frau Dr. med. Seifart (Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg) überlassen, die diese Patienten ebenfalls als Kontrollgruppe in eine molekulargenetische Studie eingeschlossen hat. Die Personen waren Patienten der Chirurgie, die keine internistischen Erkrankungen aufwiesen.



Die Etablierung der allelspezifischen IL-4R $\alpha$  Polymorphismen-Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) sowie teilweise die Gewinnung der Positivkontrollen für das normale und das polymorphe Allel erfolgte anhand einer Gruppe von ca. 25 Personen, die sich für diesen Zweck Blut abnehmen hatten lassen.

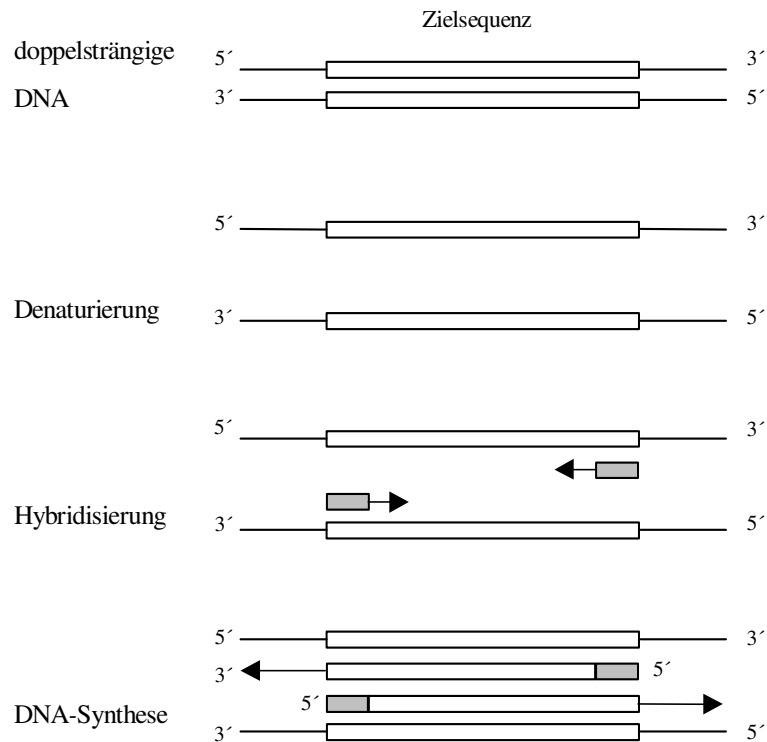
### 2.2.2 Probenaufbereitung

Für die vorliegende Arbeit konnte auf die schon im Rahmen der Studie gewonnene DNA aus Biopsien und peripherem Blut zurückgegriffen werden. Zur DNA-Gewinnung waren die Proben zunächst mit 20  $\mu$ l einer 20 mg/ml (w/v) Proteinase K-Lösung und 50  $\mu$ l 10%igem Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert worden. Anschließend war eine Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion durchgeführt worden. Die DNA wurde daraufhin mit 3 M Natriumacetat gefällt und in 100-1000  $\mu$ l TE, pH 8.0, gelöst. Um Qualität und Quantität der eingesetzten DNA der MALT-Lymphom Patienten sicherzustellen, war jeweils im Rahmen der oben erwähnten Studie die Amplifikation des  $\beta$ -Interferon-Genes als Referenzgen durchgeführt worden. Für die allelspezifische PCR der IL-4R $\alpha$  Polymorphismen wurde je nach Verfügbarkeit DNA aus peripherem Blut oder Biopsien verwendet. Die DNA-Extraktion der Blutproben der Kontrollgruppe war mit einem QIAamp®DNA Mini Kit erfolgt. Die DNA zur Etablierung der allelspezifischen IL-4R $\alpha$  Polymorphismen-PCR wurde nach Isolierung der weißen Blutzellen (Dextran-Separierung, siehe 2.3.2) entweder mittels eines DNA Präparationskits nach Protokoll des Herstellers QIAamp®DNA Mini Kit oder mittels der Phenol/Chloroform-Isoamylalkoholmethode (s.o.) gewonnen. Die Überprüfung der Qualität erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese und einer  $\beta$ -Interferon-PCR.

### 2.2.3 Allelspezifische IL-4 Rezeptor $\alpha$ -PCR

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt definierte Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Abschnitte vervielfältigt werden können. Sie wurde Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis entwickelt (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986). Das Prinzip der PCR beruht auf der enzymatischen Vermehrung einer DNA-Zielsequenz zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Konstruktion der Primer setzt die

Information über die Nukleotidsequenzen beiderseits des zu amplifizierenden DNA - Abschnittes voraus. Eine hitze-stabile DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingun-gen und in Gegenwart der vier Desoxy-nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTPs) die Primer entlang der DNA-Matrize und



**Abb. 2** Ablauf eines PCR-Zyklus. Die vielfache Wiederholung der Schritte Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese ermöglicht die Amplifizierung eines Genabschnittes.

synthetisiert so neue DNA-Stränge, die komplementär zur Matrize sind. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als Matrizen für die weitere DNA-Synthese. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei zeitlich genau aufeinander abgestimmten Reaktionen, für die verschiedene Temperaturen erforderlich sind. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 93-95 °C. Bei 50-70 °C schließt sich die Hybridisierung der im Überschuss hinzu gegebenen Oligonukleotidprimer an die komplementären Sequenzen der DNA-Stränge an. Im dritten Schritt heftet die DNA-Polymerase bei 70-72 °C Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und realisiert so die Synthese der Ziel-DNA-Sequenz. Die DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion wieder als Doppelstränge vor. Nach wenigen Zyklen stellt der zwischen den Primern umfasste DNA-Abschnitt die dominierende Sequenz dar. In der Praxis werden 20-40 Zyklen für eine Amplifizierung benötigt. Die PCR-Methode kann mit Hilfe von Thermocyclern, die die Temperaturzyklen steuern, automatisiert werden. Die Abbildung 2 zeigt die drei Reaktionen eines PCR-Zyklus.

Die Genotypisierung der sieben IL-4R $\alpha$  Polymorphismen erfolgte mit einer allelspezifischen PCR. Es wurden sieben von Hackstein et al. publizierte Primersets verwendet (Hackstein et al. 1999). Bei der PCR hängt die DNA-Synthese entscheidend von der richtigen Basenpaarung am 3'-Ende der Primer ab. Daher verwendet man für die

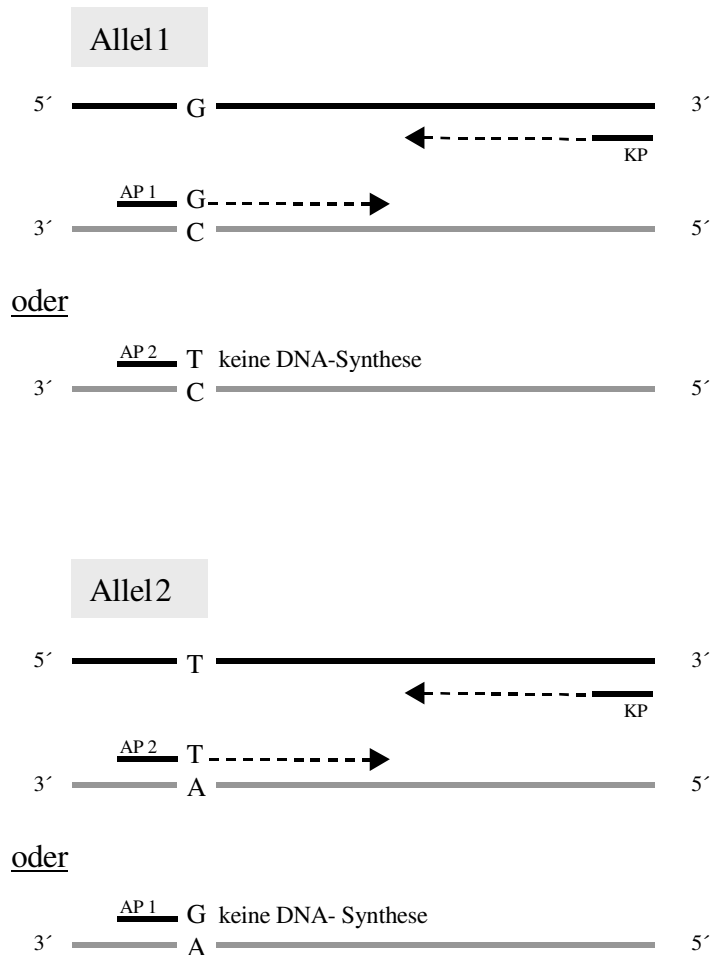
allelspezifische PCR Primer, die sich in *einem* Nukleotid am äußeren 3'-Ende unterscheiden. Diese Methode

ermöglicht so die Abgrenzung von Allelen, die sich nur in einer Base (Punktmutation, Polymorphismus) unterscheiden. Das Prinzip der allelspezifischen PCR wird in Abbildung 3 veranschaulicht.

Die Typisierung in heterozygot, homozygot für den Wildtyp bzw. homozygot für den mutierten Typ erfordert die Durchführung von zwei PCRs pro Probe. In der vorliegenden Arbeit

wurde entsprechend der konservierte Primer in Kombination mit dem jeweiligen allelspezifischen Primer verwendet. Die allelspezifischen Primer sind in Tabelle 3 (siehe 2.1.5) an der Markierung 1 bzw. 2 zu erkennen.

Ein Reaktionsansatz von 25  $\mu$ l enthielt ca. 50 ng DNA und setzte sich aus den in Tabelle 8 aufgeführten Reagenzien zusammen. Die MgCl<sub>2</sub> Konzentration war



**Abb. 3** Prinzip der allelspezifischen PCR. AP: allelspezifischer Primer; KP: konservierter Primer. AP1 hybridisiert nur mit Allel 1, eine fehlerhafte Anlagerung des T am 3'-Ende des AP2 an das C von Allel 1 verhindert eine DNA-Synthese. AP2 bindet im Gegensatz zu AP1 an Allel 2 und ermöglicht hier die DNA-Synthese.

1.5 mM. Die Sequenzen der Primer sowie die sich ergebende Länge des jeweiligen PCR-Produktes sind in Tabelle 3 (siehe 2.1.5) dargestellt

Reagenz	Endkonzentration
GeneAmp®10x PCR Buffer	1x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM
5'-Primer	0,5 µM*
3'-Primer	0,5 µM*
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	0.02 U/µl

**Tab. 8** Reaktionsansatz für die IL-4Rα Polymorphismen-PCR; \*: I50V, E375A, S478P: 1 µM

Die Reaktionsbedingungen der jeweiligen allelspezifischen IL-4Rα Polymorphismen-PCRs zeigen Tabelle 9 und 10.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präaktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	10
Hybridisierung/Elongation	65 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	21*
Hybridisierung	61 °C	50 sec	
Elongation	72 °C	40 sec	

**Tab. 9** Reaktionsbedingungen der IL-4Rα Polymorphismen-PCR (außer Q551R, siehe Tab. 10). \*E375A: 22 Zyklen, I50V:20 Zyklen

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Prä-Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 min	10
Hybridisierung	65 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Denaturierung	95 °C	30 sec	21
Hybridisierung	61 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	

**Tab. 10** PCR-Reaktionsbedingungen der Q551R Polymorphismus-PCR.

Bei jedem PCR-Ansatz wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Diese bestanden aus verdünnter Plasmid-DNA, die das jeweilige DNA-Fragment enthielt. Die Positivkontrolle der Wildtyp-PCR bestand somit aus dem Wildtypallel, die Negativkontrolle aus dem mutierten Allel. Für die PCR zur Detektion des mutierten

Allels verhielt es sich entsprechend umgekehrt. Die Kontrollplasmide für die Polymorphismen I50V, E375A, Q551R und S761P wurden gewonnen wie ab 2.2.4 beschrieben. Für die Varianten C406R, S411L und S478P wurden andere Primer verwendet (siehe 2.1.5, Tabelle 5); im Weiteren entsprach das Vorgehen ebenfalls der Beschreibung ab 2.2.4.

Um Kontaminationen zu vermeiden wurde bei allen Versuchsansätzen auf eine strenge räumliche Trennung von „Vor-“ und „Nach“- PCR Bereichen geachtet. Des Weiteren wurden aerosol-resistente Filterpipettenspitzen verwendet.

Die Beurteilung der Amplifikation erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in 3%igen Agarosegelen. Für die Agarosegele wurden 3 g eines Agarose/Nusieve Gemisches (1:1) zu 100 ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt, erhitzt und in einen Gelträger gegossen. Die PCR-Produkte wurden mit Gelladepuffer versetzt und neben 1 µg eines DNA-Markers (123Bp) zur Abschätzung der Fragmentlänge aufgetragen. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml (w/v) Ethidiumbromid zu Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) und Gel wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar. Die optische Darstellung der DNA erfolgte nach der Elektrophorese (~1½ h, bei 80 V) auf einem UV-Durchleuchtungstisch bei 254 nm. Das Ergebnis wurde mit einer Polaroidkamera festgehalten.

### **2.2.4 Klonierung**

Die Validation der allelspezifischen PCRs erfolgte mittels Sequenzierung von PCR-Produkten. Da der Nachweis von Polymorphismen (Austausch einer einzelnen Base) geführt wurde, wurden die relevanten DNA-Fragmente zu diesem Zweck kloniert und im Anschluss daran sequenziert.

#### **2.2.4.1 PCR und Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel**

Es wurden je Polymorphismus sechs Proben kloniert. Von den Polymorphismen I50V, E375A, C406R, S478P und Q551R wurden zwei Proben pro möglichem Genotyp verwendet. Da für die S411L bzw. die S761P-Variante der Genotyp homozygot für das mutierte Allel nicht vorlag, wurden drei heterozygote und drei homozygote Wildtyp-Proben (S411L) bzw. eine heterozygote und fünf homozygote Wildtyp-Proben (S761P) kloniert.

Für die PCR, die die PCR-Produkte für die Klonierung generierte, wurden Primerpaare verwendet, die den polymorphen Locus umspannten. Die entsprechenden Oligonukleotide sind in Tabelle 4 (siehe 2.1.5) aufgeführt. Der 50 µl-Reaktionsansatz enthielt ca. 50 ng DNA und entsprach der in Tabelle 8 (siehe 2.2.3) dargestellten Zusammensetzung (Primer: ausnahmslos 0,5 µM, AmpliTaqGold abweichend von Tab.8: 0,01 U/µl); die PCR-Bedingungen finden sich in Tabelle 11.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Prä-Aktivierung der AmpliTaqGold	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	31
Hybridisierung	60 °C	40 sec	
Elongation	72 °C	40 sec	

**Tab. 11** Reaktionsbedingungen für die IL-4Rα-PCR, die die-PCR-Produkte für die Klonierung lieferte.

Die Klonierung erforderte eine Aufreinigung der PCR-Produkte. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen; die Elektrophorese lief wie oben beschrieben ab. Unter UV-Durchleuchtung wurden die spezifischen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss das jeweilige PCR-Produkt mit dem GENE CLEAN® Spin Kit aus dem Gelstück extrahiert. Diesem Kit liegt das von Vogelstein beschriebene Prinzip zugrunde, dass Nukleinsäuren in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen an Silicatpartikel binden und sich bei niedriger Salzkonzentration wieder lösen (Vogelstein und Gillespie 1979). Das jeweilige Gelstück wurde mit einer stark salzhaltigen Lösung, die die Silikatpartikel enthielt, versetzt und im Wasserbad bei 55 °C geschmolzen. Die gebundene DNA wurde mehrfach mit einer Ethanollösung gewaschen und mit sterilem Wasser eluiert.

### 2.2.4.2 Ligation, Transformation und Plasmid isolation

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden unter Verwendung eines Vektors in Bakterien eingeschleust. Die DNA-Fragmente konnten so infolge des schnellen Bakterienwachstums in kurzer Zeit vermehrt werden.

Die Ligation und Transformation erfolgten mit dem TOPO<sup>TM</sup>TA Cloning Kit. Für die Einbringung des DNA-Fragments in den Vektor (Ligation) macht sich dieses Verfahren zunutze, dass die Taq-Polymerase an das 3'-Ende der DNA jedes PCR-Produktes ein Desoxyadenosin anhängt. Der linearisierte pCR® 2.1-TOPO®-Vektor

trägt an seinem 3'-Ende ein einzelnes komplementäres Desoxythymidin. An dieses können die PCR-Produkte mit Hilfe der Topoisomerase I, die kovalent an den Vektor gebunden ist, angelagert werden.

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur und 10 min Inkubation in einem 6 µl Ansatz, bestehend aus ca. 100 ng PCR-Produkt, 10 ng des pCR® 2.1-TOPO-Vektors, Salzlösung und dH<sub>2</sub>O.

Die Transformation des Plasmidvektors in kompetente *E.coli* Bakterien (TOP10F<sup>-</sup>) verlief wie folgt: 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli* gegeben, 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C und 225 rpm in den Schüttelinkubator gestellt. Im Anschluss wurden 100 µl und 200 µl der Bakterien auf Luria-Bertani(LB)-Agarplatten ausgestrichen, in denen jeweils 50 µg/ml (w/v) Ampicillin und 40 µg/ml (w/v) 5Brom-4Chlor-3Indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal) enthalten waren. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

Der Plasmidvektor verleiht den Bakterien Ampicillinresistenz. Die Zugabe von Ampicillin zum LB-Medium führt daher zur Selektion von vektorhaltigen Bakterien. Bakterien, die einen Plasmidvektor aufgenommen haben, der das DNA-Fragment nicht eingebaut hat, können über das Blau-Weiß-Screening erkannt werden. Der Einbau der Fremd-DNA verschiebt das Leseraster des lacZ-Genes, das für einen Teil der β-Galactosidase kodiert. X-Gal kann von β-Galaktosidase hydrolysiert werden und durch Luftoxidation zu einem blauen Farbstoff umgesetzt werden. Folglich nehmen Kolonien der Bakterien, die das DNA-Fragment enthalten, keine blaue Farbe an.

Es wurden mindestens zehn weiße Kolonien pro Probe in 4 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und dem oben beschriebenen Prinzip der Bindung von DNA an Silikatpartikel in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (Birnboim und Doly 1979; Vogelstein und Gillespie 1979). Zunächst wurde die bakterielle,

genomische DNA von der Plasmid-DNA getrennt. Hierzu wurden die Bakterien mit NAOH/SDS lysiert und parallel die bakterielle RNA mit RNAasen verdaut. Im nächsten Schritt fielen durch Denaturierung mittels eines stark salzhaltigen Puffers Proteine und auch die proteingebundene genomische DNA und zellulärer Debris aus, während die proteinfreie Plasmid-DNA in Lösung blieb. Die Zentrifugation dieses Überstandes über eine Säule mit Silikatmembran bewirkte die Adsorption der Plasmid-DNA. Weitere Waschschrte entfernten restliche Nukleaseaktivität der Bakterien und Salze. Abschließend wurde die DNA in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.4.3 Restriktionsverdau

Die Kontrolle der einzelnen Plasmid-DNA-Klone wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die spezifisch eine definierte DNA-Sequenz schneiden, durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Schnittstellen für *EcoRI* im pCR® 2.1-TOPO®-Vektor beiderseits des insertierten DNA-Fragments genutzt. Der Restriktionsverdau fand in einem 10 µl Ansatz aus ca. 500 µg Plasmid-DNA, einer Einheit des Restriktionsenzym *EcoRI* und 1 µl Buffer 0+ statt. Der Ansatz wurde für 120 min bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch dargestellt.

### 2.2.5 Sequenzierung

Es wurden je klonierter Probe mindestens acht verschiedene Subklone sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren nach der Cycle-Sequenzierungs-Technik, einer Variante der von Sanger et al. 1977 beschriebenen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977). Es wurde eine zyklische Markierungsreaktion durchgeführt, in die in einem definiertem Verhältnis Desoxynukleotide (dNTPS) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt wurden. Wenn ein ddNTP eingebaut wird, erfolgt ein Kettenabbruch, da den ddNTPs die zur Verlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Die entstehenden Fragmente unterscheiden sich in der Länge um jeweils eine Base und tragen den für das jeweils eingebaute ddNTP spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Die vier Farbstoffe können alle durch einen Argonlaser bei 488 nm angeregt werden, haben ihre Fluoreszenzmaxima jedoch bei unterschiedlichen Wellenlängen, so dass die vier ddNTPs zusammen in einem Ansatz eingesetzt werden können (ddATP: R6G/545 nm; ddTTP:



TAMRA/580 nm; ddCTP: ROX/605 nm; ddGTP: R110/530 nm). Die Elektrophorese in einem denaturierenden, hochauflösenden Gel ermöglicht die Auftrennung selbst von Fragmenten, die sich nur in einer Base unterscheiden. Das kleinste Fragment, bei dem es schon nach der ersten Base nach dem Primer zum Kettenabbruch kam, läuft am schnellsten, wird als erstes detektiert und markiert somit das erste Nukleotid in der Sequenz; das nächstgrößere Fragment markiert das zweite Nukleotid und so weiter. Die Detektion erfolgt folgendermaßen: während der Elektrophorese wird ein Laserstrahl konstant auf eine bestimmte Stelle des Gels fokussiert; wenn die markierten DNA-Fragmente die Stelle passieren, regt der Laser die Farbstoffe zur Fluoreszenz an und das entstehende Signal kann mit einer CCD-Kamera detektiert werden. Die Ableitung der Nukleotidsequenz erfolgt computergestützt.

Für die durchgeführten Sequenzreaktionen diente ein Oligonukleotid als Primer, das seine Bindungsstelle im Vektor auf einer Seite des PCR-Produktes hat. Für alle Fragmente konnte damit der T7-Primer verwendet werden. Die Sequenzreaktion erfolgte in 20 µl Ansätzen aus ca. 500 ng Plasmid-DNA, 200 nM T7-Primer und 4 µl eines Reaktionsgemisches aus dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Das Reaktionsgemisch besteht aus den fluoreszenzmarkierten ddNTPs, dNTPs, Tris-HCL (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub>, thermostabiler Pyrophosphatase und AmpliTaq® DNA Polymerase. Die Sequenzreaktion lief in einem Thermocycler PE 9600 unter den in Tabelle 12 angegebenen Reaktionsbedingungen ab.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 sec	25
Hybridisierung	55 °C	15 sec	
Elongation	60 °C	4 min	

**Tab. 12** Bedingungen der Sequenzreaktion

Die durch die Sequenzreaktion generierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 3000 g für 2 min über Sephadexsäulen von überschüssigen ddNTPs gereinigt. Die Sephadexsäulen wurden aus 600 µl einer 83 mg/ml (w/v) Sephadex G-50 Lösung durch Zentrifugation bei 3000 g für 1 min über ProbeQuant G-50 Micro Columns gewonnen. Die Sequenzreaktion wurde in einer Vakuumzentrifuge für ca. 40 min getrocknet und anschließend in 4 µl einer 1:5 Ladepuffer: Formamid Lösung gelöst.

Die Denaturierung der Proben über 2 min bei 90 °C und anschließend die Lagerung auf Eis erfolgte unmittelbar bevor der Gelelektrophorese.

Die Analyse der Sequenzprodukte wurde mit dem automatischen ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzer durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung fand in einem denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel statt. Das Gel setzte sich zusammen aus 21 g Harnstoff, 6 ml 10x TBE-Puffer, 21 ml dH<sub>2</sub>O und 8,4 ml 30%igem Acrylamid/Bisacrylamid (29:1). Der Harnstoff wirkt während der Elektrophorese als kontinuierlich denaturierendes Agens. Das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt die Vernetzungsdichte des Gels. Die Gellösung wurde entgast und über einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Für die Polymerisation wurden 300 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung als Reaktionsstarter und 20 µl TEMED als Vernetzer zugesetzt. Die Gellösung wurde dann sofort zwischen zwei Glasplatten gegossen, polymerisierte 1½ h und konnte dann in die Elektrophoreseeinheit des DNA Sequencers eingespannt werden. Jeweils 1,5 µl der Proben wurden nach 30 min Vorlauf aufgetragen. Die Elektrophoresen (7 h, 51 °C, 30 Watt) fanden in 1x TBE-Puffer als Laufpuffer statt. Die Datensammlung und Analyse erfolgte mit der ABI PRISM™-Software 377-96 Data Collection v2.5 und der Sequencing Analysis v3.3. Software.

### **2.2.6 Datenauswertung**

Die Gruppierung der Sequenzen der untersuchten Klone einer Probe erfolgte mit dem Programm DNASTAR. Hiervon wurden die Programme Edit Seq 4.05 und Meg Align 4.05 verwendet.

Die statistische Auswertung der Unterschiede in der Verteilung der Allelfrequenzen bzw. Genotypen zwischen MALT-Lymphompatienten und Kontrollen erfolgte mit Fisher's exaktem Test. Das statistisch Signifikanzlevel war  $p < 0,05$ . Es wurde die Software „GraphPad Prism ®“ in der Version 5. verwendet.

## **2.3 IL-4 und IFN- $\gamma$ -Expression**

### **2.3.1 Patienten und Kontrollkollektiv**

Die mRNA-Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  wurde zunächst zur Etablierung der Methode in Leukozyten untersucht. Es fanden sich 23 freiwillige gesunde Spender peripheren Blutes (14 Frauen und 9 Männer) deren Altersmedian bei 24 Jahren (Altersbereich 21- 44) lag.

Es konnten 15 MALT-Lymphom Patienten in die Untersuchung der mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  im Tumorgewebe eingeschlossen werden. Acht Patienten waren in die unter 2.2.1 beschriebene Studie eingeschlossen. Sieben Patienten entstammen der Multicenterstudie „Gastrointestinale Lymphome“ von Prof. Fischbach (Universitätsklinikum Würzburg); diese Studie konnte ab März 1993 95 Patienten mit MALT-Lymphomen einschließen (Fischbach et al. 2004). Die Gruppe der 15 Patienten umfasste zwölf Frauen und drei Männer. Der Altersmedian der Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 60 Jahren (Altersbereich 39-75 Jahre). Die Patienten hatten ein Lymphom vom MALT-Typ im Stadium I<sub>E</sub> bzw. II<sub>E</sub>. Die IL-4 mRNA-Expression wurde an einer Untergruppe von sieben Patienten untersucht (fünf Frauen, zwei Männer, Altersmedian 62 Jahre). Die verwendeten Tumorbiopsien wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gastrokopisch gewonnen.

Als Kontrollkollektiv dienten Biopsien von 15 *H. pylori* positiven Gastritiden, die uns zu diesem Zweck freundlicherweise von Frau Dr. med. Dierlamm (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) und Dr. med. Meier (Internist und Gastroenterologe, Amberg) überlassen wurden. Es handelte sich um Gastritis-Biopsien von acht Frauen und sieben Männern; der Altersmedian lag bei 58 Jahren (Altersbereich 33-82 Jahre). Die IL-4 mRNA-Expression wurde an einer Untergruppe von sieben Patienten untersucht (fünf Frauen, zwei Männer, Altersmedian 68 Jahre, Altersbereich 38-82 Jahre).

### **2.3.2 Probenaufbereitung: Extraktion von mRNA und cDNA-Synthese**

Die RNA aus den MALT-Lymphombiopsien lag aus den Studien schon vor und wurde in die cDNA-Synthese eingebracht.

Die RNA-Extraktion der Gastritisbiopsien basierte auf der von Chomczynski und Sacchi entwickelten Methode (Chomczynski und Sacchi 1987), deren Prinzip beruht

auf der Eigenschaft von RNA in Gegenwart von denaturierendem Guanidinium-Thiozyanat und organischen Lösungsmitteln wasserlöslich zu bleiben. Die einzelnen Schritte (auf Eis) werden im Folgenden beschrieben. Zunächst wurde die Tumorbiopsie in einem Handhomogenisator aus Glas mit Teflonstempel in 900 µl RNazol homogenisiert, in ein 1,5 ml Eppendorff-Röhrchen überführt, mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, geschüttelt (30 sec), 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 4 °C, 12000 g). Nach der Zentrifugation befanden sich in der unteren organischen Phase sowie in der Interphase Proteine, Zellfragmente und genomische DNA, wohingegen in der oberen, wässrigen Phase die RNA gelöst war. Die obere Phase wurde vorsichtig abgehoben und zur Fällung der RNA 1:1 mit Isopropanol versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Nach Zentrifugation (20 min, 4 °C, 12000 g) wurde der Überstand abgehoben und das RNA-Pellet zur Entfernung von Salzresten mit 75%igem Ethanol resuspendiert und abschließend erneut zentrifugiert (20 min, 4 °C, 12000 g). Der Überstand wurde abgehoben und das RNA-Pellet in 30 µl DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Leukozyten der Spender des heparinisierten, peripheren Blutes wurden mittels Dextran-Separierung gewonnen. Das Mischungsverhältnis Blut:Dextran betrug 5:1. Nach einer Inkubation von 40 min befanden sich in der oberen Phase Leukozyten, Thrombozyten und Plasma, in der unteren Phase die Erythrozyten. Die obere Phase wurde abgehoben, zentrifugiert (10 min, 370 g), der Überstand abgehoben und verworfen. Zur Elimination von im Zellpellet verbliebenen Erythrozyten wurde dieses mit 10 ml 1x Lysepuffer resuspendiert und nach 5 min zentrifugiert (10 min, 370 g). Der Überstand über dem jetzt weißlichen Zellpellet wurde abgegossen, das Pellet mit 10 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 370 g). Aus den Zellen wurde dann wie oben beschrieben RNA extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und die Qualität der RNA durch Agarose-gelelektrophorese in 2%igen Gelen (siehe Elektrophorese 2.2.3) abgeschätzt.

Die RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert (Reverse Transkription bzw. cDNA-Synthese). Die cDNA-Synthese kann mit beliebigen Hexameren gestartet und durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, katalysiert werden. Ein Ansatz enthielt in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 µg RNA, 5 µM random Hexamer pd (N<sub>6</sub>), 0,625 mM dNTPs,

10 mM DTT und 1x PCR-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Nach Denaturierung (70 °C, 10 min) und Abkühlung auf Eis wurde je Ansatz 40 U RNasin und 200 U SuperScript™ Reverse Transkriptase hinzugegeben und zunächst 10 min bei Raumtemperatur, anschließend 40 min bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms folgten 5 min Erhitzung bei 90 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Konventionelle IL-4 und IFN-γ-PCR

Zur Darstellung der IL-4- und IFN-γ-RNA-Expression wurde an einem kleineren MALT-Lymphom-Subkollektiv eine konventionelle PCR durchgeführt. Als Referenzgen diente GAPDH. Die verwendeten Primer zeigt Tabelle 6 (siehe 2.1.5). Der 25 µl PCR-Ansatz enthielt ca. 50 ng cDNA und setzte sich aus den in Tabelle 13 dargestellten Reagenzien zusammen. Die Reaktionsbedingungen der konventionellen IL-4- bzw. IFN-γ-PCR zeigt Tabelle 14. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese in 3%igen Agarosegelen.

Reagenz (25 µL Ansatz)	Endkonzentration des	
	IL-4-/IFN-γ-Ansatzes	GAPDH-Ansatzes
Magnesiumchlorid	3,75 mM	5,5 mM
PCR Buffer <sup>1</sup>	1x	1x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) <sup>2</sup>	0,2 mM	0,2 mM
Forward Primer	200 nM	300 nM
Reverse Primer	200 nM	300 nM*
AmpliTaq Gold Polymerase	0,025 U/µl	0,025 U/µl

**Tab. 13** Reaktionsansatz der konventionellen IL-4/IFN-γ-PCR.

*Real-Time-PCR:* <sup>1</sup> TaqMan PCR Buffer A anstelle von PCR-Buffer, <sup>2</sup> dUTP (0,4 mM) anstelle von dTTP  
zusätzlich: AmpEase UNG: 0,01 U/µl und die jeweilige IL-4/IFN-γ/GAPDH-Sonde (200 nM)

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präktivierungsschritt	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	40
Hybridisierung/ Elongation	60 °C	1 min	

**Tab. 14** Reaktionsbedingungen der konventionellen IL-4/ IFN-γ-PCR

*Real-Time-PCR:* Es wurde 1 Zyklus zum UNG-Verdau vorgeschaltet: 50 °C, 2 min

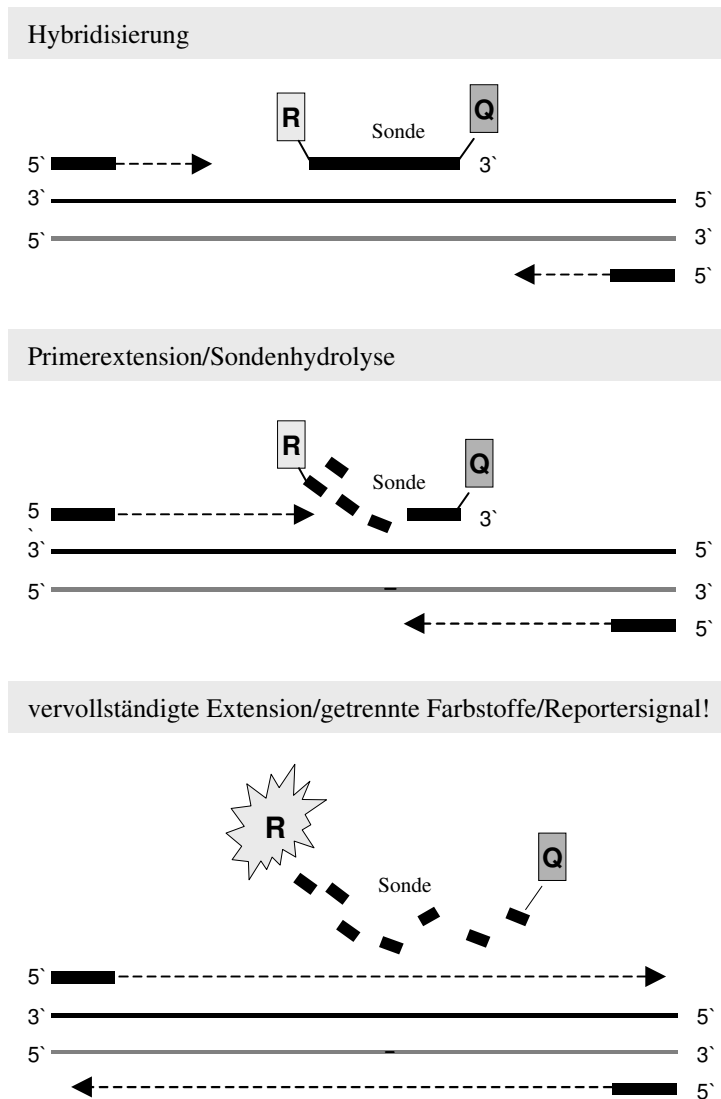
## 2.3.4 IL-4 und IFN- $\gamma$ - Real-Time-PCR

### 2.3.4.1 Prinzip der Real-Time-PCR

Eine Möglichkeit Genexpressionen zu quantifizieren bietet das Real-Time TaqMan<sup>TM</sup> PCR-Prinzip. Es macht sich zwei Entdeckungen der frühen 90er Jahre zunutze: zum einen das von Holland et al. beschriebene 5' Nuklease PCR-Assay unter Ausnützung der 5'-Exonuklease-

aktivität der Taq Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation; zum anderen die von Lee et al. 1993 entwickelten fluorogenen Sonden (Holland et al. 1991; Lee et al. 1993). Die fluorogene Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszin-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Die Anregung der intakten Sonde bei einer

spezifischen Wellenlänge führt nicht zur Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs, da diese aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt wird.



**Abb. 4** Prinzip des TaqMan<sup>TM</sup> PCR-Assay. R: Reporter, Q: Quencher

Zur Durchführung des Real-Time-PCR-Assays wird ein PCR-Reaktionsansatz erstellt, der neben den üblichen PCR-Reagenzien: PCR-Puffer, dNTPs, sequenzspezifischen Primern,  $MgCl_2$  und Taq Polymerase, auch die fluorogene sequenzspezifische Sonde enthält. Nach dem Denaturierungs-Schritt der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an die zu amplifizierende Sequenz. Während des Extensionsschrittes trifft die AmpliTaq DNA-Polymerase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert wird und in der Folge die Sonde hydrolysiert wird. Die freie, nicht hybridisierte Sonde hingegen wird nicht geschnitten. Die Sondenhydrolyse bewirkt, dass die räumliche Nähe zwischen Reporterfarbstoff und Quencherfarbstoff und damit auch der FRET unterbrochen wird, so dass der ABI Prism™ 7700 Sequence Detector Fluoreszenz messen kann (s.u.). Proportional zur Akkumulation des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Der 7700 Sequence Detector misst Zyklus für Zyklus die zunehmende Fluoreszenz im geschlossenen Reaktionsgefäß. Das entstehende Signal ist strikt sequenzspezifisch, da zum einen die sequenzspezifische Hybridisierung der Sonde an die Matrize die grundlegende Voraussetzung für die Aktivierung der Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq Polymerase ist und zum anderen nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität aktiviert wird. Die TaqMan-PCR erreicht so eine hohe Spezifität und erlaubt eine Quantifizierung ohne Post-PCR-Schritte. Eine graphische Veranschaulichung des Prinzips des Real-Time PCR-Assays zeigt Abbildung 4.

Die Untersuchung wurde mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (7700 SDS) mit der ABI Prism™ Sequence Detection Systems v1.6.3. Software durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgt vollständig über einen Power Macintosh 4400. Das 7700 SDS besitzt einen eingebauten Thermocycler mit einem optischen Heizdeckel. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels eines Argonlasers bei 488nm. Der Laserstrahl wird mit Hilfe eines Multiplexers über optische Lichtleiter über den einzelnen Positionen verteilt. Über jeder Position befindet sich eine Linse, die den Lichtstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß weiterleitet, wo die Fluoreszenzemission angeregt wird. Die Fluoreszenz verlässt den Thermocycler über

den jeweils selben optischen Leiter wieder, wird auf einen Spektrographen geleitet und mittels einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Die TaqMan PCR wird in speziellen optischen Reaktionsgefäßen ausgeführt, die keine störende Autofluoreszenz besitzen.

Das Signal der TaqMan<sup>TM</sup> PCR repräsentiert die Veränderung der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde. Der so genannte Threshold Cycle (Ct-Werte) ist die relevante Messgröße für die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren, die der 7700 SDS ermittelt. Er drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Grundlinie erfasst wird (s.u.).

### **2.3.4.2 IL-4 und IFN- $\gamma$ -Real-Time-PCR**

Der 25  $\mu$ l PCR-Ansatz enthielt ca. 50 ng cDNA und entsprach der in Tabelle 13 (siehe 2.3.3) dargestellten Zusammensetzung der konventionellen PCR mit den in der Tabellenbeschriftung angegebenen Abweichungen, die im Folgenden kurz erläutert werden.

In der PCR-Reaktion wurde dTTP durch dUTP ersetzt. Die Taq-Polymerase hat eine ähnliche Affinität zu dUTP wie zu dTTP, so dass die Amplikons letztlich Uracil, das Substrat der AmpErase® Uracil-N-Glycosylase (UNG), enthalten. Wird der PCR-Reaktionsansatz mit UNG vorbehandelt, katalysiert diese die Hydrolyse uracilhaltiger Nukleinsäuren, so dass jegliche Übertragung von Verunreinigungen durch frühere, dUTP-haltige PCR-Produkte ausgeschlossen wird. Der UNG-Verdau erfolgt bei 50 °C für 2 min (siehe 2.3.3, Tabelle 14). Im anschließenden Ampli-Taq-Aktivierungsschritt von 95 °C über 10 min erfolgt die Inaktivierung der UNG. Des Weiteren wurde zusätzlich die entsprechende Sonde in den PCR-Reaktionsansatz eingebracht. Die Auswahl der jeweils geeigneten Sonde muss berücksichtigen, dass die Hybridisierung der Sonde, da sie nicht zur Extension kommt, im Gegensatz zu den Primern während der Extensionsphase nicht zusätzlich durch die Ampli-Taq Polymerase stabilisiert wird. Eine stabile Hybridisierung stellt die Voraussetzung für die nachfolgende Sondenhydrolyse dar. Es ergeben sich somit folgende Konsequenzen:

- ◆ der  $T_m$  der Sonde sollte mindestens 5 °C über dem der PCR-Primer liegen



- ◆ da die AmpliTaq Gold Polymerase auch bei Temperaturen  $> 55^{\circ}\text{C}$  eine signifikante Aktivität aufweist, kann man auf den  $72^{\circ}\text{C}$  Extensionsschritt verzichten und einen kombinierten Hybridisierungs/Extensions-Schritt bei einem  $T_m$  unter dem der Sonde in die PCR einführen (durch die erhöhte Hybridisierungstemperatur steigt auch die Spezifität der PCR)
- ◆ eine höhere Mg-Ionenkonzentration ( $\text{MgCl}_2$ : 3,5-6 mM) wirkt ebenfalls stabilisierend auf die Hybridisierung der Sonde (Schild T., vers.2.1).

Die verwendeten Primer und Sonden finden sich in Tabelle 6 (siehe 2.1.5); die TaqMan PCR-Reaktionsbedingungen in Tabelle 14 (siehe 2.3.3). Von jeder Probe und den Standards wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden Negativkontrollen für die Zielgene und das Referenzgen GAPDH mitgeführt.

#### **2.3.4.3 Quantifizierung der IL-4 und IFN- $\gamma$ -Real-Time-PCR**

Die Quantifizierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers Applied Biosystems des ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection Systems (Schild T., vers.2.1). Es wurde relativ quantifiziert, d. h. die Zielsequenz wurde relativ in ihrer Expression zu einer zweiten Sequenz bestimmt. Diese Sequenz entsprach dem Referenzgen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das als endogene Amplifikationskontrolle fungierte. Hierdurch kann bei der Quantifizierung der Zielsequenz-mRNA auf Unterschiede in der Gesamtmenge der RNA normalisiert werden.

Es erfolgte die Erstellung von Standardkurven mit einer Probe bekannter Konzentration der Zielsequenz und der Referenzsequenz. Die Quantifizierung erfolgt jeweils relativ zum gewählten Standard, d.h. das Ergebnis ist ein Zahlenwert, der das gemessene Signal der Probe im Vergleich zu den Werten des Standards widerspiegelt. Als Standard wurde eine Probe verwendet, die aus Plasmid-DNA der entsprechenden Zielsequenz bzw. Referenzsequenz bestand. Die Erstellung der Plasmid DNA erfolgte analog wie unter 2.2.4 beschrieben. Die verwendeten Plasmid-DNAs wurden sequenziert (analog zu 2.2.5), um die korrekte Basensequenz zu verifizieren. Die Stammlösung für die Erstellung der Verdünnungsstufen des Standards wurde einmal erstellt und eine ausreichende Menge aliquotiert und eingefroren, um mehrfache Auftauschritte zu vermeiden. Die Verdünnungsstufen

bestanden aus vier Verdünnungsschritten von jeweils 1:10, entsprechend bestand die Standardkurve aus fünf Stufen von 1 bis 0,0001.

Für die Quantifizierung ist der vom 7700 Sequence Detection System erhobene Ct-Wert wesentlich. Die Ausgangsmenge der Zielsequenz kann über die Standardkurven mit der im Folgenden beschriebenen Berechnung (jeweils für Ziel- und Referenzgen) bestimmt werden. Die Erstellung der Standardkurve, der Eichgeraden wie auch die nachfolgenden Berechnungen wurden mit der Microsoft®Excel 1997 SR-1 Software durchgeführt. Mit den Daten log der jeweiligen Verdünnungsstufe des Standards und dem Ct-Wert der jeweiligen Verdünnungsstufe des Standards kann die Standardkurve erstellt werden. Die x-Achse ist als log der Verdünnungsstufe, die y-Achse als Ct-Wert definiert. Die Gleichung der Geraden ( $Y = mx + b$ ) wird benutzt, um die Ausgangsmenge der Ziel bzw. Referenzsequenz in den untersuchten Proben zu bestimmen. In die hierzu verwendete Formel gehen die Werte m und b der Geraden der erstellten Standardkurve und der Ct-Wert der jeweiligen untersuchten Probe ein. Die Formel lautet:

$$\blacklozenge \quad \log \text{ der Ausgangsmenge} = (Ct - b)/m.$$

Die Ausgangsmenge berechnet sich aus:

$$\blacklozenge \quad 10^{\log \text{ Ausgangsmenge}}.$$

Die errechnete Ausgangsmenge entspricht der Einheit der Standardkurve, in diesem Fall der einheitslosen Verdünnungsstufe. Anschließend wird die Zielsequenzmenge normalisiert, indem sie durch die Referenzsequenzmenge dividiert wird, so dass die einheitslosen normalisierten Zielsequenzwerte resultierten. Diese einheitslosen Werte der relativen Zielsequenzmenge entsprechen damit einer „arbitrary unit“ (AU).

### 2.3.5 Datenauswertung

Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mRNA-Level zwischen den zwei Patientengruppen (MALT-Lymphome/*H. pylori*- Gastritiden) erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test unter Verwendung des Programms GraphPad Prism® Version 5. Das statistische Signifikanzlevel war  $p < 0,05$ . Die Graphen wurden ebenfalls mit GraphPad Prism® Version 5. erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der IL-4 Rezeptor $\alpha$ Polymorphismen

##### 3.1.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten

Die 99 Patienten mit einem MALT-Lymphom, die auf die IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen untersucht wurden, unterzogen sich im Rahmen der Studie einer *Helicobacter pylori*-Eradikation. 84 Patienten erzielten hinsichtlich des MALT-Lymphoms eine komplette Remission, zehn eine partielle Remission, vier Patienten sprachen nicht auf die Therapie an und ein Patient zeigte eine Progredienz des Lymphoms. Im weiteren Verlauf wurden 67 kontinuierliche Remissionen, drei Rezidive, neun minimale Resterkrankungen und in fünf Fällen der Verdacht auf eine minimale Resterkrankung beobachtet. Sieben Patienten sind verstorben: vier an einem Herzinfarkt bzw. einer Herzinsuffizienz, zwei an einem Schlaganfall und ein Patient an einem Kolonkarzinom.

##### 3.1.2. Allelspezifische IL-4 Rezeptor $\alpha$ -PCR

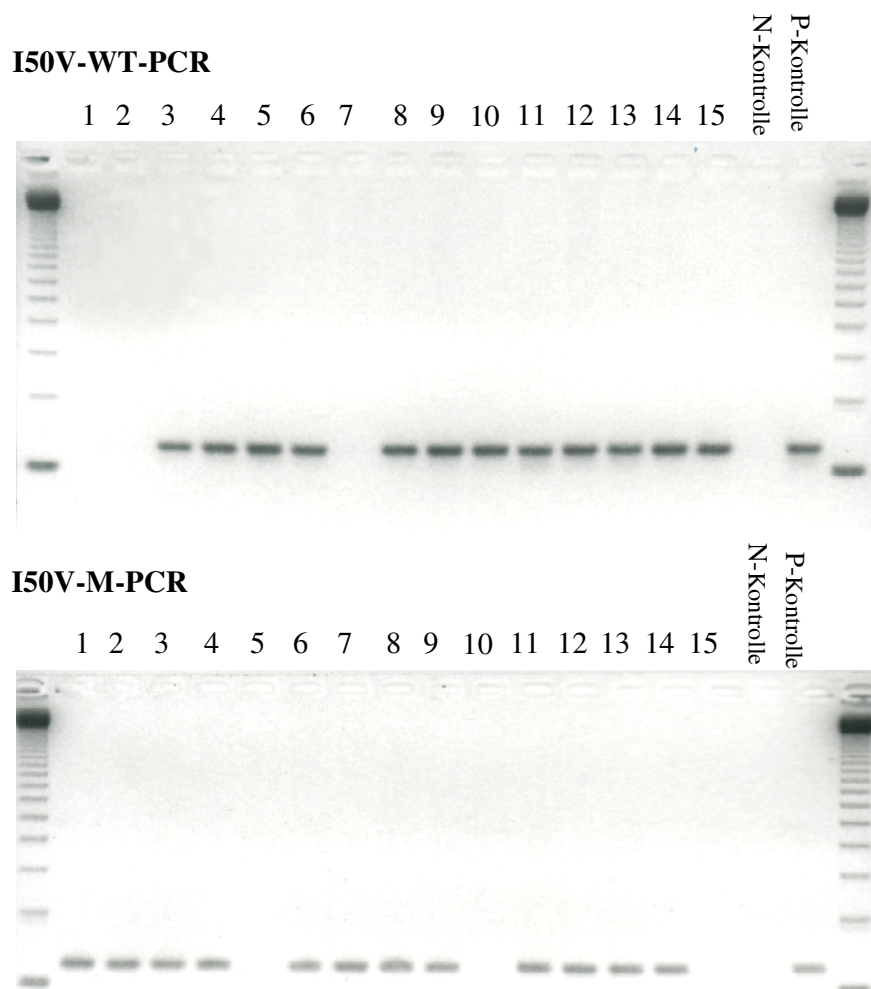
Die Abbildung 5 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismus-PCR (I50V). Es werden 15 Ergebnisse dargestellt. Jede Probe wurde in zwei PCRs eingesetzt, zum einen zur Detektion des Wildtyp-Allels und zum anderen zur Detektion des mutierten Allels. Wurde nur das Wildtyp-Allel oder nur das mutierte Allel nachgewiesen, entsprach dies dem Genotyp homozygot für den Wildtyp beziehungsweise homozygot für das mutierte Allel. Ergab sich in beiden PCRs ein Nachweis eines Allels entsprach das Ergebnis dem heterozygoten Genotyp (siehe auch Text zur Abbildung 5 (nächste Seite)).

Es wurden 120 Kontrollpersonen und 99 Patienten mit einem niedrigmalignen MALT-Lymphom auf die sieben IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen untersucht. Für eine Probe aus der Kontrollgruppe konnte aufgrund unzureichender DNA-Qualität kein Ergebnis für die Polymorphismen C406R, S411L und S761P erzielt werden.

Gleiches gilt für eine Probe aus der Gruppe der MALT-Lymphome für den Polymorphismus S411L.

Die Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe entsprach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium (Chi-Quadrat-Test). Die Verteilung der Allelfrequenzen in der Kontrollgruppe entsprach den bekannten publizierten Allelfrequenzen in Normalpopulationen.

Die Ergebnisse der IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen-PCR können in zwei unterschiedlichen Darstellungen präsentiert werden (siehe Tab.15/16). Zum einen kann die Gesamtzahl der untersuchten Allele (Wildtyp-Allel versus mutiertes Allel), zum anderen die Genotypenverteilung betrachtet werden.



**Abb. 5** PCR-Foto einer I50V-Polymorphismus-PCR. WT-PCR: PCR, die das Wildtyp-Allel detektiert. M-PCR: PCR, die das mutierte Allel detektiert. N-Kontrolle: Negativ-Kontrolle; P-Kontrolle: Positiv-Kontrolle. Beispiel: Reihe 1=homozygot mutiert, Reihe 3=heterozygot, Reihe 5= homozygoter Wildtyp.

Die Tabelle 15 zeigt die Verteilung der Allelfrequenzen der sieben IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen für die Kontrollen und die Patienten mit einem MALT-Lymphom. Allelfrequenz bedeutet, dass die absolute Anzahl untersuchter Allele, also zwei je Person, betrachtet wird. Die Allelfrequenz wird durch Division der Anzahl des jeweiligen Allels durch die Anzahl aller Allele berechnet. Die Verteilung der Allelfrequenzen für alle sieben Polymorphismen unterscheidet sich in den beiden Gruppen nicht (p-Wert in Tabelle 15, Fisher's exakter Test).

Gruppe	Proben- anzahl	IL-4R Poly- morphismus	Allelfrequenz n(%)		p-Wert vs. Kontrolle
			Wildtyp-Allel	mutiertes Allel	
Kontrollen	120	<b>I50V</b>	140 (58 %)	100 (42 %)	0,38
Patienten	99		107 (54 %)	91 (46 %)	
Kontrollen	120	<b>E375A</b>	207 (86 %)	33 (14 %)	0,30
Patienten	99		178 (90 %)	20 (10 %)	
Kontrollen	119	<b>C406R</b>	205 (86 %)	33 (14 %)	0,14
Patienten	99		180 (91 %)	18 (9 %)	
Kontrollen	119	<b>S411L</b>	229 (96 %)	9 (4 %)	0,37
Patienten	98		185 (94 %)	11 (6 %)	
Kontrollen	120	<b>S478P</b>	195 (81 %)	45 (19 %)	0,53
Patienten	99		166 (84 %)	32 (16 %)	
Kontrollen	120	<b>Q551R</b>	190 (79 %)	50 (21 %)	0,47
Patienten	99		163 (82 %)	35 (18 %)	
Kontrollen	119	<b>S761P</b>	237 (100 %)	1 (0 %)	1,0
Patienten	99		198 (100 %)	0 (0 %)	

**Tab. 15** Verteilung der Allelfrequenzen der sieben IL-4R $\alpha$  Polymorphismen für die MALT-Lymphompatienten und die Kontrollen \*Anwendung von Fisher's exaktem Test.

Die Tabelle 16 zeigt die Verteilung der Genotypen der sieben IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen für die MALT-Lymphompatienten und die Kontrollen. Die statistische Analyse (Fisher's exakter Test) der Genotypenverteilung zeigt, dass das Vorhandensein eines mutierten Allels (Genotyp heterozygot bzw. homozygot für das mutierte Allel) nicht mit dem Vorliegen eines MALT-Lymphoms assoziiert ist.

Gruppe	Proben- anzahl	IL-4R Poly- morphismus	Genotyp		
			<i>homozygot Wildtyp</i>	<i>heterozygot</i>	<i>homozygot Mutante</i>
Kontrollen	120	<b>I50V</b>	42 (35 %)	56 (47 %)	22 (18 %)
Patienten	99		29 (29 %)	49 (50 %)	21 (21 %)
Kontrollen	120	<b>E375A</b>	90 (75 %)	27 (22,5 %)	3 (2,5 %)
Patienten	99		80 (81 %)	18 (18 %)	1 (1 %)
Kontrollen	119	<b>C406R</b>	89 (75 %)	27 (22,5 %)	3 (2,5 %)
Patienten	99		82 (83 %)	16 (16 %)	1 (1 %)
Kontrollen	119	<b>S411L</b>	110 (92 %)	9 (8 %)	0 (0 %)
Patienten	98		87 (89 %)	11 (11 %)	0 (0 %)
Kontrollen	120	<b>S478P</b>	80 (67 %)	35 (29 %)	5 (4 %)
Patienten	99		69 (70 %)	28 (28 %)	2 (2 %)
Kontrollen	120	<b>Q551R</b>	74 (62 %)	42 (35 %)	4 (3 %)
Patienten	99		66 (67 %)	31 (31 %)	2 (2 %)
Kontrollen	119	<b>S761P</b>	118 (99 %)	1 (1 %)	0 (0 %)
Patienten	99		99 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

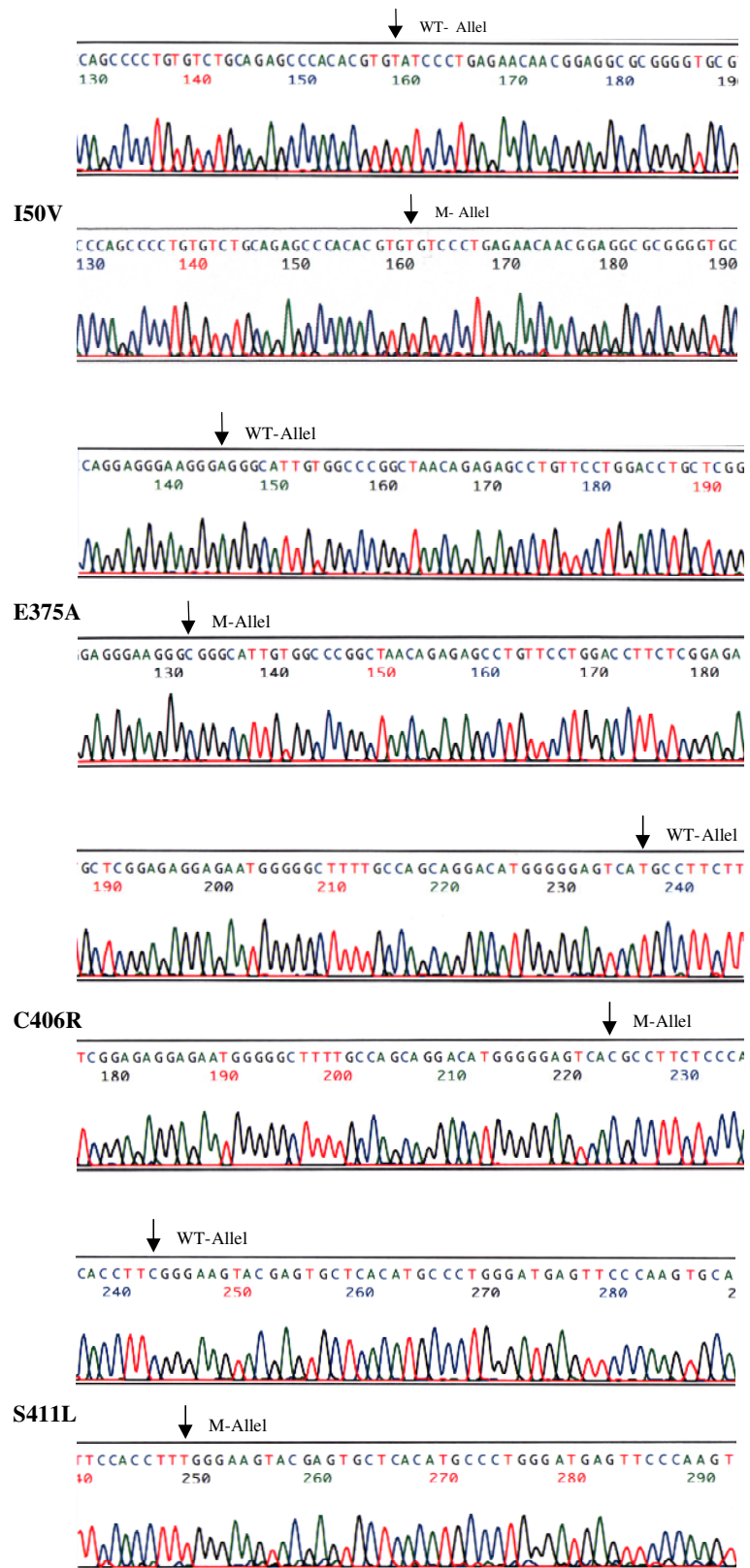
**Tab. 16** Verteilung der Genotypen der sieben IL-4R $\alpha$  Polymorphismen für die MALT-Lymphompatienten und die Kontrollen. Alle p-Werte > 0,05; Fishers's exakter Test.

### 3.1.3 Sequenzierung

Die Validierung der Ergebnisse der allelspezifischen IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen-PCRs mittels Sequenzierung der relevanten DNA-Regionen ergab eine 100%ige Übereinstimmung der Ergebnisse der Sequenzierung mit denen der allelspezifischen PCRs.

Pro IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismus

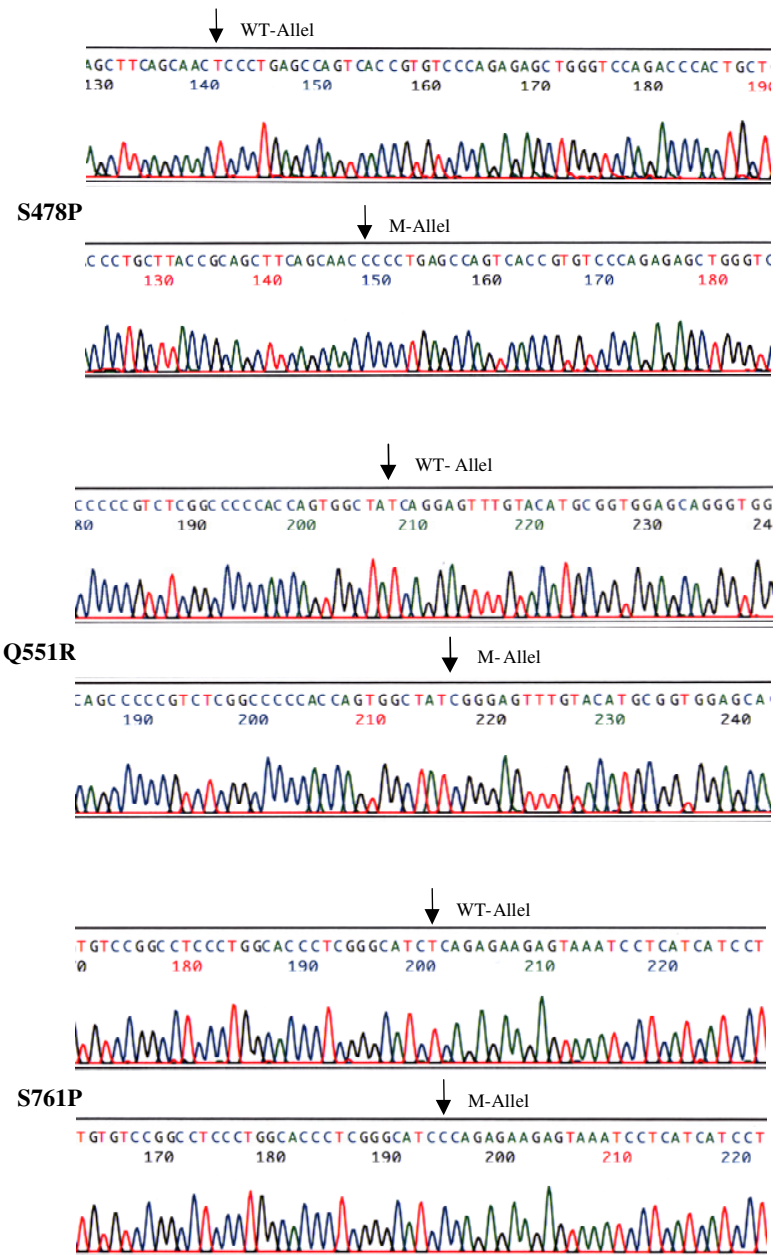
wurden sechs verschiedene Proben untersucht, insgesamt damit  $7 \times 6 = 42$ . Die entsprechenden PCR-Produkte wurden kloniert und es wurden je Probe mindestens acht Subklone sequenziert. Die Zuordnung zu den drei möglichen Genotypen ergab sich wie folgt: zeigten alle acht Klone am polymorphen Locus das Nukleotid des



**Abb. 6** Ausschnitte aus den Sequenzierungen der Regionen des IL-4 Rezeptors für I50V, E375A, C406R und S411L. Je IL-4 Rezeptorpolymorphismus ist beispielhaft ein Wildtyp-Allel (WT-Allel) und ein mutiertes Allel (M-Allel) dargestellt. Pfeil: polymorpher Locus.

Wildtyps, wurde die Probe als homozygot für den Wildtyp gewertet. Analog wurde Verfahren, wenn ausschließlich das mutierte Allel detektiert wurde. Das Vorhandensein von unterschiedlichen Allelen markierte den heterozygoten Genotyp. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine auf dieser Grundlage als homozygot eingestufte Probe in Wirklichkeit einem heterozygoten Genotyp entspricht, liegt bei  $p = 0,0039$ . Die Abbildungen 6 und 7 zeigen beispielhaft Ausschnitte aus den relevanten Bereichen der Sequenzierungen der IL-4 Rezeptor  $\alpha$

Polymorphismen. Es ist jeweils ein Wildtyp-Allel und ein mutiertes Allel dargestellt. Das betroffene polymorphe Nukleotid wird durch den Pfeil markiert.



**Abb. 7** Ausschnitte aus den Sequenzierungen der Regionen des IL-4 Rezeptors für S478P, Q551R und S761. Je IL-4 Rezeptorpolymorphismus ist beispielhaft ein Wildtyp-Allel (WT-Allel) und ein mutiertes Allel (M-Allel) dargestellt. Pfeil: polymorpher Locus.



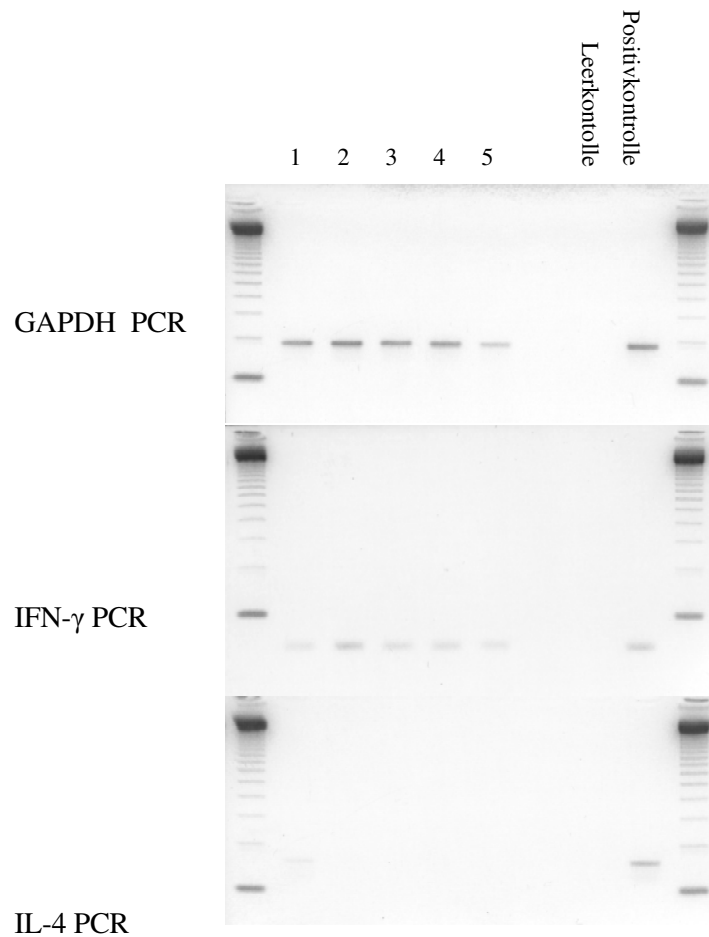
### 3.2. Ergebnisse der IL-4 und IFN- $\gamma$ -Expression

#### 3.2.1 Konventionelle PCR

In der Abbildung 8 werden beispielhaft die Banden einer PCR für die Gene IL-4 und IFN- $\gamma$  den Banden der entsprechenden GAPDH PCR gegenübergestellt. Die Abbildung gibt einen visuellen Eindruck des Expressionsniveaus der beiden Gene in den MALT-Lymphompatienten. Diese Darstellung ist als visuelle Überleitung zu den Ergebnissen der Real-Time-PCR sinnvoll, da diese letztlich abstrakte Zahlen als Ergebnis liefert.

Die Abbildung 8 zeigt vergleichend die gewohnte

Darstellung. In Reihe 1-5 sind jeweils die Ergebnisse für fünf MALT-Lymphompatienten aufgetragen. Die GAPDH PCR zeigt mit kräftigen Banden die befriedigende Qualität der cDNA an. Die IFN- $\gamma$  PCR visualisiert mit den schwachen Banden die im Vergleich zum Referenzgen GAPDH wesentlich geringere Expression von IFN- $\gamma$ . Die IL-4 PCR lässt lediglich für die Probe in Reihe 1 eine sehr schwache Bande erkennen. Ein quantitativer Vergleich zwischen den Proben ist bei dem insgesamt niedrigen Expressionsniveau erschwert, bei fehlender Darstellung von Banden auf dem Agarosegel, wie hier bei den Proben 2-5 der IL-4 PCR, wird er unmöglich. Die Real-time-PCR sollte hier bessere Ergebnisse liefern.



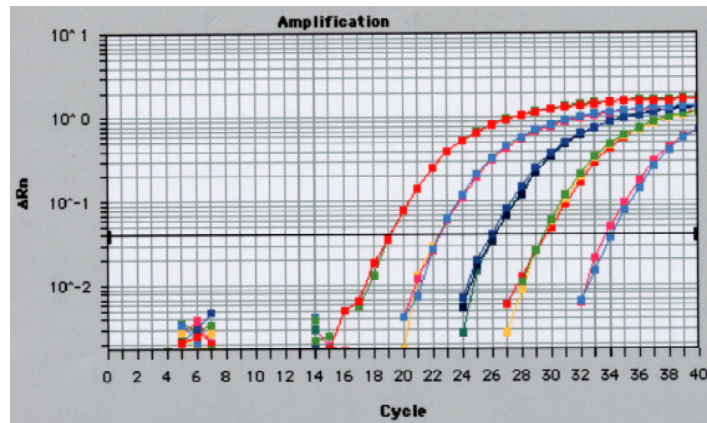
**Abb. 8** PCR für IL-4, IFN- $\gamma$ , GAPDH, Reihe 1-5: MALT-Lymphom-Patienten

### 3.2.2 Real-Time-PCR

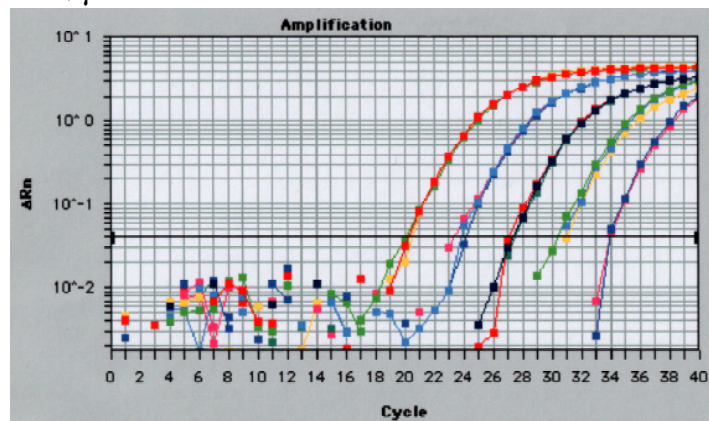
#### 3.2.2.1 Standardkurven und Präzision

Da die Quantifizierung der mRNA-Expression der Zielgene von den Standardkurven für die Zielgene und das Referenzgen abhängt, ist es sehr wichtig die Verdünnungsschritte für die Erstellung der Standardkurven exakt vorzunehmen, da die Ergebnisse sonst ungenau werden. In der Abbildung 9 werden beispielhaft Standardkurven für IL-4, IFN- $\gamma$  und GAPDH gezeigt, so wie sie vom 7700 SDS generiert werden. Der Ct-Wert wird am Schnittpunkt der Kurven mit der Grundlinie abgelesen. Der umspannte Ct-Wert Bereich, bei GAPDH z.B. Ct-Wert 19-34 (Abb. 9) entspricht jeweils dem Bereich in dem das Expressionsniveau der untersuchten Proben lag. Bei GAPDH liegt dieser

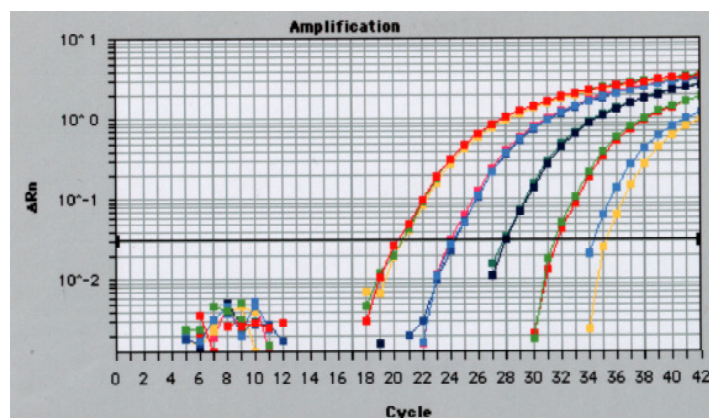
#### GAPDH



#### IFN- $\gamma$



#### IL-4



**Abb. 9** Standardkurven von GAPDH, IFN- $\gamma$  und IL-4. Aufgetragen ist auf der X-Achse die gemessene Fluoreszenz, auf der Y-Achse die Zyklenanzahl der PCR. Verdünnungsstufen jeweils 1:10 (1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001) bei Dreifachbestimmung.

Bereich weiter links in Richtung niedrigerer Ct-Werte, da so dem höheren Expressionsniveau von GAPDH besser entsprochen wird.

Die Neigung der Standardkurve beschreibt die Effizienz der PCR. Eine Neigung von 3,33 beschreibt eine 100%ige Effizienz. Die Standardkurven aller Untersuchungen, die in die vorliegende Arbeit eingegangen sind, wiesen folgende durchschnittliche Neigungen (engl.: slopes) auf: IL-4: -3,73; IFN- $\gamma$ : -3,52; GAPDH: -3,63. Dies entspricht einer durchschnittlichen Effizienz der PCRs von etwa 90 %. Der Korrelationsquotient zeigt, wenn er größer als 0,99 ist, eine präzise lineare Beziehung zwischen dem Ct-Wert und dem log der Verdünnungsstufe auf. Der Korrelationskoeffizient war in allen Experimenten für IL-4, IFN- $\gamma$  und GAPDH > 0,99; der mittlere Korrelationskoeffizient für alle Untersuchungen und Gene betrug 0,997.

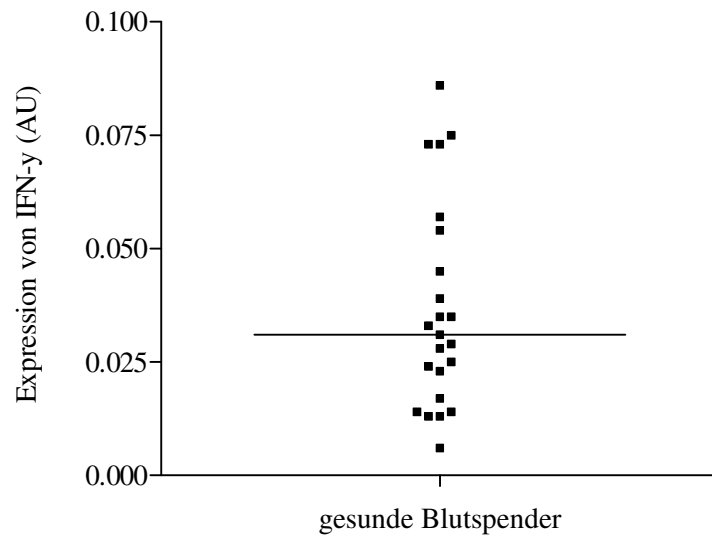
Die Präzision der Untersuchungen, also die Variabilität der Ergebnisse, die während einer Untersuchung bzw. zwischen unterschiedlichen Untersuchungen auftritt wurde mittels Durchführung von Intra- und Interassay bestimmt. Die Expression einer identischen Probe 10mal während einer Untersuchung des 7700 SDS (Intraassay) und die Expression einer identischen Probe während aller Untersuchungen des 7700 SDS (Interassay), die in diese Arbeit eingegangen sind (IL-4: n=5, IFN- $\gamma$ : n=8), wurde bestimmt. Der Variationskoeffizient für das Intraassay betrug für IL-4: 11,88 % und für IFN- $\gamma$ : 9,88 %. Der Variationskoeffizient für das Interassay betrug für IL-4: 14,29 % und für IFN- $\gamma$ : 17,21 %.

### **3.2.2.2 Ergebnisse der IL-4 und IFN- $\gamma$ Real-Time-PCR**

Die Berechnung der relativen Expressionen von IL-4 und IFN- $\gamma$  erfolgte anhand der Standardkurven wie unter 2.3.4.3 beschrieben. Die relativen Expressionen von IFN- $\gamma$  und IL-4 in „arbitrary units“ für die untersuchte cDNA der Leukozyten der 23 freiwilligen Blutspender sind in den Tabellen 17 und 18 aufgeführt. Die graphische Darstellung in Form eines Wolkendiagramms findet sich in den Abbildungen 10 und 11. In den Punkt-Wolkendiagrammen ist in Form des horizontalen Strichs jeweils der Median der Expression aufgetragen. Der Mittelwert der Expression beträgt für IL-4: 0,006; der Median beträgt 0,003. Der Mittelwert der Expression beträgt für IFN- $\gamma$ : 0,037; der Median beträgt 0,031.

Nr.	IFN- $\gamma$ Expression (AU)
1	0,029
2	0,045
3	0,073
4	0,024
5	0,025
6	0,033
7	0,014
8	0,057
9	0,039
10	0,014
11	0,075
12	0,054
13	0,035
14	0,017
15	0,086
16	0,028
17	0,073
18	0,035
19	0,031
20	0,013
21	0,013
22	0,023
23	0,006

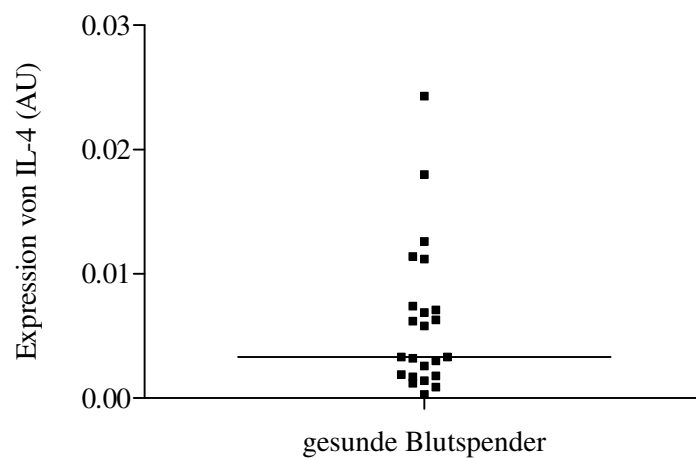
**Tab. 17** IFN- $\gamma$ -Expression der gesunden Personen



**Abb. 10** IFN- $\gamma$ -Expression der gesunden Personen mit Median, n=23

Nr.	IL-4 Expression (AU)
1	0,0126
2	0,0243
3	0,0071
4	0,0069
5	0,0114
6	0,0009
7	0,0018
8	0,0014
9	0,003
10	0,0019
11	0,0063
12	0,0033
13	0,0062
14	0,0003
15	0,0074
16	0,0112
17	0,018
18	0,0058
19	0,0032
20	0,0033
21	0,0017
22	0,0012
23	0,0026

**Tab. 18** IL-4-Expression der gesunden Personen



**Abb. 11** IL-4-Expression der gesunden Personen mit Median, n=23

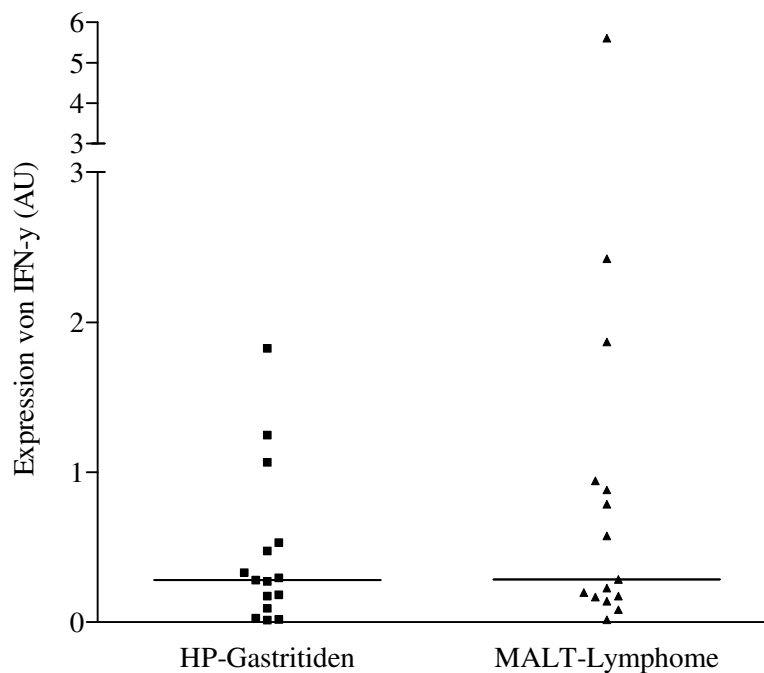
In den Tabellen 19 und 20 sind die Expressionen für IFN- $\gamma$  in „arbitrary units“ in den 15 untersuchten *H. pylori*-Gastritiden und den 15 untersuchten MALT-Lymphomen aufgeführt. Die Abbildung 12 zeigt ein Punkt-Wolkendiagramm mit der vergleichenden Darstellung der Expressionen für IFN- $\gamma$  in den beiden Gruppen.

Nr.	IFN- $\gamma$ Expression (AU)
1	1,067
2	0,014
3	0,018
4	0,027
5	1,248
6	0,183
7	0,092
8	0,53
9	0,175
10	1,826
11	0,475
12	0,273
13	0,295
14	0,331
15	0,28

**Tab. 19** IFN- $\gamma$ -Expression der *HP*- Gastritiden

Nr.	IFN- $\gamma$ Expression (AU)
1	0,787
2	0,227
3	0,14
4	0,169
5	0,175
6	0,084
7	0,015
8	5,615
9	0,197
10	1,868
11	0,944
12	0,575
13	2,424
14	0,285
15	0,881

**Tab. 20** IFN- $\gamma$  -Expressione der MALT-Lymphome



**Abb. 12** Expression von IFN- $\gamma$  in den Gastritiden und MALT-Lymphomen im Vergleich, jeweils mit Median

Im Wolkendiagramm ist in Form des horizontalen Strichs jeweils der Median eingetragen. Der Mittelwert der IFN- $\gamma$  Expression in der MALT-Lymphomgruppe beträgt 0,959; der Median beträgt 0,285. Der Mittelwert der Expression in der Gruppe der *Helicobacter pylori*-Gastritiden beträgt 0,456, der Median beträgt 0,28. Die statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U-Test zeigte in den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von IFN- $\gamma$ . Es zeigt sich somit eine konstante, zwischen den beiden Gruppen nicht differierende Expression von IFN- $\gamma$ . Die Expression in beiden Gruppen ist höher als in den Leukozyten der gesunden Personen.

Eine Expression von IL-4 in den untersuchten MALT-Lymphom und den *H. pylori* positiven Gastritiden war im Wesentlichen nicht nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde jeweils lediglich eine kleinere Untergruppe von sieben Patienten mit *H. pylori* Gastritiden bzw. MALT-Lymphomen untersucht. In der Gruppe der sieben Gastritiden war lediglich in einer Probe eine Expression von 0,000235 nachzuweisen. Eine zweite Probe zeigte, bei durchgeführter Dreifachbestimmung, lediglich ein Signal, so dass für diese Probe eine minimalste IL-4 Expression angenommen werden muss, ohne dass ein Expressionswert errechnet werden kann. Die restlichen fünf Proben zeigten keine IL-4 Expression. In der Gruppe der sieben MALT-Lymphome zeigte eine Probe eine IL-4 Expression von 0,0475 (bei allerdings nur zwei Signalen). Eine weitere Probe zeigte ebenfalls nur ein Signal, so dass eine minimalste IL-4 -Expression angenommen werden kann. Die restlichen fünf Proben zeigten keine IL-4 Expression. In den Leukozyten der gesunden Personen war konstant eine geringe Expression von IL-4 nachweisbar.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methodendiskussion**

Da die Bestimmung der Allelfrequenzen der IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen mittels einer allelspezifischen PCR erfolgte, deren Schwierigkeit darin besteht, dass sich die Primer für das Wildtypallel und das mutierte Allel nur in einer Base unterscheiden, ist die Überprüfung der Ergebnisse mittels Sequenzierung wichtig. Es ergab sich für acht stichprobenartig untersuchte Proben je IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismus eine 100%ige Übereinstimmung des Ergebnis von Sequenzierung und allelspezifischer PCR. Darüber hinaus korrelieren die erhobenen Allelfrequenzen aller IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen in der Kontrollgruppe gut mit den bekannten in der Literatur vorbeschriebenen Allelfrequenzen (Hackstein et al. 1999). Es kann damit davon ausgegangen werden, dass die in der vorgelegten Arbeit erhobenen Allelfrequenzen für alle IL-4 R $\alpha$  Polymorphismen die Realität widerspiegeln.

Die Bestimmung des mRNA-Expressionsniveaus mittels einer Real-Time-PCR erfordert akkurates Pipettieren, da bereits kleinste Volumenänderungen beim Pipettieren der cDNA der Proben bzw. der Standards große Verfälschungen der Ergebnisse nach sich ziehen können. Zudem ist es unerlässlich, die Untersuchungsbedingungen unterschiedlicher Ansätze der Real-Time-PCR so identisch wie möglich zu halten. Die erfolgte Dreifachbestimmung pro Probe diene der Minimierung von Verfälschungen durch Ungenauigkeiten beim Pipettieren. Die erstellten Standardkurven waren für alle Gene in allen durchgeführten Untersuchungsansätzen mit einem Korrelationsquotienten von  $> 0,99$  von sehr guter Qualität. Die Intraassayvariabilität berechnet für das jeweilige Expressionsniveau der untersuchten Gene zeigt mit jeweils  $\sim 10\%$  eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Untersuchung an. Die Interassayvariabilität fällt naturgemäß etwas schlechter aus und liegt mit jeweils  $\sim 15,5\%$  etwas über den optimalerweise angestrebten  $\leq 10\%$ .

### **4.2 Ergebnisdiskussion**

Es sind eine Reihe von Polymorphismen bekannt, die die Entstehung von malignen Tumoren begünstigen können bzw. mit dem Auftreten dieser assoziiert sind.

Mehrheitlich handelt es sich um Polymorphismen in Genen, die für Enzyme kodieren, die eine Rolle bei der Metabolisierung von Karzinogenen spielen. In diesem Zusammenhang wird z. B. eine Assoziation von Polymorphismen des Gens der N-Acetyltransferase 2 (NAT2) mit kolorektalen Karzinomen sowie von Polymorphismen in Genen der Cytochrom P450-Enzym-Familie (CYP) mit Lungen- bzw. Mammakarzinomen diskutiert (Mucci et al. 2001). Für Polymorphismen in Interleukingenen bzw. -rezeptoren gibt es weniger Untersuchungen, die einen solchen Zusammenhang nahe legen. Interessanterweise scheint es für das Magenkarzinom, für das *H. pylori* ebenfalls als Risikofaktor gilt, eine solche Assoziation zu geben. In zwei Studien konnten Polymorphismen im Interleukin-1-Gen als Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen festgestellt werden. Postuliert wurde, dass die Polymorphismen zu einer erhöhten Sekretion des proinflammatorischen sowie die Magensäureproduktion inhibierenden IL-1 $\beta$  führen und es im Rahmen der fortschreitenden Gastritis zu DNA-Schäden kommt, die schließlich in der Entwicklung eines Magenkarzinoms münden (El-Omar et al. 2000; Machado et al. 2001). Auch MALT-Lymphom-Patienten wurden von zwei Arbeitsgruppen auf das Vorliegen dieser Polymorphismen untersucht. Sie kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen: Hellmig et al. konnten in der Studie mit der größeren Fallzahl, im Gegensatz zu Rollinson et al., die Polymorphismen im IL-1b-Gen nicht als Risikofaktoren für das Auftreten von MALT-Lymphomen feststellen (Hellmig et al. 2004; Rollinson et al. 2003). Im weiteren Zusammenhang konnte bezüglich prädisponierender Polymorphismen in immunologisch relevanten Genen eine negative Assoziation zwischen dem Auftreten von MALT-Lymphomen und dem heterozygoten Genotyp des Asp299Gly-Polymorphismus im Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) nachgewiesen werden; diskutiert wird, dass der heterozygote Genotyp über verringerte Signalvermittlung über den Rezeptor die B-Zellaktivierung vermindert und so einer Stimulation durch *H. pylori*-Lipopolysaccharid (LPS) protektiv entgegen wirken könnte (Hellmig et al. 2005).

Unter der Annahme, dass IL-4 Rezeptor Polymorphismen mit der Entstehung von MALT-Lymphomen assoziiert sein könnten, wurden in dieser Arbeit 99 Lymphome vom MALT-Typ und 120 Kontrollen auf das Vorliegen der bekannten sieben, die Aminosäuresequenz der IL-4 Rezeptor  $\alpha$ -Kette verändernden, Polymorphismen



untersucht. Die Vermutung einer Assoziation zwischen IL-4R $\alpha$  Polymorphismen und MALT-Lymphomen basiert auf der Überlegung, dass IL-4, das zentrale T<sub>H</sub>2-Zytokin in der Entwicklung und Fortführung einer T<sub>H</sub>2-Zellantwort, über diesen Rezeptor seine Wirkung entfaltet. Sollte es sich bei den, oder einem Teil der IL-4R $\alpha$  Polymorphismen um „Gain-of-function-Mutationen“ handeln (d.h. erhöhte/verstärkte Signaltransduktion über den Rezeptor, wie von Hershey et al. diskutiert, siehe 1.3.3.2), könnte die konsekutiv erhöhte IL-4/(T<sub>H</sub>2)-Wirkung die B-Zellproliferation der Lymphome vom MALT-Typ unterstützen. Die mutmaßliche Abhängigkeit der B-Zellproliferation in MALT-Lymphomen von T<sub>H</sub>2-Zytokin-produzierenden tumorinfiltrierenden T<sub>H</sub>-Zellen ist (siehe 1.1.4) besprochen worden. Die vorliegende Untersuchung auf sieben IL-4Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen zeigte keinen Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen den MALT-Lymphompatienten und der Kontrollgruppe. Es waren auch keine Trends bezüglich einer Assoziation eines bestimmten Polymorphismus mit den MALT-Lymphomen festzustellen. Es ergibt sich damit kein Anhalt dafür, dass einer der IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen eine Prädisposition für das Auftreten von MALT-Lymphomen darstellt.

Die mutmaßliche Assoziation von IL-4R $\alpha$  Polymorphismen mit T<sub>H</sub>2-vermittelten Erkrankungen und die Hinweise auf eine Polymorphismus-assoziierte vermehrte Signaltransduktion über den IL-4R $\alpha$  lassen vermuten, dass die Polymorphismen die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigen können. Allerdings konnte eine neuere Studie an transfizierten B-Zellen, die den IL-4R $\alpha$  mit den Polymorphismen I50V (Valin als Mutante) und Q576R trugen, keine erhöhte IL-4 induzierte CD23-Expression (als Hinweis eine vermehrte Signaltransduktion über den Rezeptor) nachweisen (Franjkovic et al. 2005). Eine weitere aktuellere Studie konnte für die I50V Mutation in einer transfizierten T-Zelllinie eine erhöhte Transkriptionsaktivität von STAT6 nachweisen, allerdings erstaunlicherweise ohne den Nachweis einer IL-4 induzierten T<sub>H</sub>2-Zellentwicklung (Stephenson et al. 2004). In Anbetracht dieser Studienergebnisse und der Tatsache, dass sich die Ergebnisse bezüglich der Assoziation zwischen den IL-4R $\alpha$  Polymorphismen und atopischen Erkrankungen - wie in der Einleitung erläutert - zumindest widersprüchlich darstellen, kann aktuell nicht abschließend bewertet werden, ob die IL-4R $\alpha$  Polymorphismen die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort tatsächlich begünstigen. Sollten die IL-4R $\alpha$

Polymorphismen für die Entwicklung einer  $T_H2$ -Zellantwort nicht relevant sein, wäre auch keine Assoziation zwischen dem Vorliegen der IL-4R $\alpha$  Polymorphismen und dem Auftreten von MALT-Lymphomen zu erwarten. Dies könnte erklären, warum bei der vorliegenden Untersuchung keine erhöhte Frequenz der IL-4R $\alpha$  Polymorphismen bei MALT-Lymphompatienten gefunden wurde. Die Frage der pathophysiologischen Relevanz der Assoziation zwischen IL-4Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen und  $T_H2$ -vermittelten Erkrankungen muss Gegenstand der weiteren Forschung bleiben.

Für die Entwicklung der postulierten lokalen  $T_H2$ -Antwort in MALT-Lymphomen müssen andere disponierende Faktoren existieren. In der Frage nach den entscheidenden Faktoren der  $T_H1/T_H2$ -Polarisierung rückt in der Forschung in Bezug auf die Erkrankungen des atopischen Formenkreises die Regulation der Transkriptionsfaktoren t-bet und GATA-3 in den Mittelpunkt (siehe 1.2.6.). T-bet wird die bedeutendste Rolle bei der  $T_H1$ -Zellentwicklung, GATA-3 bei der  $T_H2$ -Zellentwicklung zugemessen. So konnte für das  $T_H2$ -assoziierte Asthma bronchiale in Bronchialgewebsbiopsien von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte GATA-3 Expression nachgewiesen werden (Christodouloupoulos et al. 2001). Auch im Mausmodell konnte durch Minderung der GATA-3 Wirkung (GATA-3 Mutanten-Expression, antisense DNA-Strategie) eine Reduktion der  $T_H2$ -Zytokinproduktion und der  $T_H2$ -induzierten pulmonalen Entzündung bewirkt werden (Zhang et al. 1999; Finotto et al. 2001). Entsprechend findet sich eine verringerte T-bet-Expression in T-Zellen von Asthmapatienten sowie eine erhöhte IL-4 Produktion in der Lunge von T-bet-defizienten Mäusen (Neurath et al. 2002). In Korrelation hierzu bewirkt die Deletion von T-bet in der C57/BL6 Maus, dass die eigentlich resistente, mit einer  $T_H1$ -Zellantwort reagierende Maus (siehe 1.2.7.1), empfindlich für *L. major* wird (Mowen et al. 2004). In der Zusammenschau scheint insbesondere die Balance zwischen den Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der polarisierten  $T_H$ -Zellantwort und der assoziierten Erkrankungen zu spielen. Zu Erforschen bleiben die Mechanismen bzw. (genetischen) Prädispositionen, die zum funktionellen Überwiegen des jeweiligen Transkriptionsfaktors und der damit einhergehenden Polarisierung der  $T_H$ -Zellentwicklung führen.

Sollte es sich bei den tumorinfiltrierenden T-Zellen in MALT-Lymphomen nicht um T<sub>H</sub>2-Zellen handeln, wäre der fehlende Nachweis einer Assoziation zwischen den IL-4 Rezeptor  $\alpha$  Polymorphismen und MALT-Lymphomen ebenfalls erklärt. Im Widerspruch zu den Studien, die eine Förderung der Proliferation der MALT-Lymphom B-Zellen durch T<sub>H</sub>2-Typ Zytokine postulieren (siehe 1.1.4), kommen andere Studiengruppen zu divergierenden Ergebnissen: D'Elis et al. verglichen nach Antigenstimulation das Zytokinprofil von T-Zellklonen, die aus MALT-Lymphomen bzw. aus *H. pylori*-Gastritiden generiert wurden (D'Elis et al. 1999). Die T-Zellen aus den Gastritiden und den MALT-Lymphomen unterschieden sich dieser Studie entsprechend nicht relevant in ihrem Zytokinproduktionsprofil, sie zeigten vielmehr überwiegend ein T<sub>H</sub>0-Profil. Hauer et al. zeigten für frisch isolierte T-Zellen aus zwei MALT-Lymphomen nach Stimulation mit *H. pylori* mittels ELISPOT ein Überwiegen von T<sub>H</sub>1- gegenüber T<sub>H</sub>2-Zellen (Hauer et al. 1997). Riedel et al. untersuchten spezifischer die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen (CD3+) getrennt für CD4- und CD8 positive T-Zellen. Ihre vergleichende FACS-Analyse tumorinfiltrierender T-Zellen aus 23 MALT-Lymphomen im Vergleich zu T-Zellen aus 19 *H. pylori*-Gastritiden ergab einen signifikant höheren Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4-positiven T-Zellen in den MALT-Lymphomen (Riedel et al. 2001). Zu den drei zitierten Studien ergeben sich allerdings folgende kritische Anmerkungen: Die von D'Elis et al. in vitro stimulierten T-Zellklone müssen nicht zwangsläufig die physiologische Situation in vivo widerspiegeln. Die von Hauer et al. bestimmten Zytokine müssen nicht (nur) von CD4 positiven Zellen stammen, sondern könnten auch von CD8 positiven Zellen oder NK-Zellen stammen. Die von Riedel et al. postulierte T<sub>H</sub>1-Dominanz in MALT-Lymphomen kann aufgrund der vorgelegten Daten nicht sicher nachvollzogen werden, da keine Daten zum Anteil IL-4 produzierender T-Zellen vorgestellt werden. Die hier selbst vorgelegten Daten bezüglich der IL-4/IFN- $\gamma$ -Expression in MALT-Lymphomen ergänzen die bereits zu der Fragestellung durchgeführten Untersuchungen. Der Vergleich der mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  in jeweils 15 MALT-Lymphomen und *H. pylori*-Gastritiden mit der mRNA-Expression von IL-4 in jeweils sieben MALT-Lymphomen und *H. pylori*-Gastritiden zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Krankheitsentitäten. Da *H. pylori*-Gastritiden einen sicher T<sub>H</sub>1-vermittelten

Krankheitsprozess darstellen, kann dieses Ergebnis als Hinweis auf ein auch in MALT-Lymphomen dominierendes  $T_H1$ -Zytokinprofil interpretiert werden. Grundsätzlich sollte zur sicheren Bestimmung der Dominanz einer  $T_H$ -Zellunterart eine  $T_H1/T_H2$ -Ratio (konkret eine  $IFN-\gamma/IL-4$ -Ratio) gebildet werden, was (auch) anhand der hier vorgestellten Daten nicht gelingt, da IL-4 in beiden untersuchten Gruppen praktisch nicht exprimiert wurde. Anzumerken ist, dass IL-4 generell nur gering exprimiert wird und oft unter der Nachweisgrenze bleibt. Die Schlussfolgerung, dass IL-4, als Marker für eine  $T_H2$ -Antwort, zumindest keine bedeutende Rolle in der Pathogenese von MALT-Lymphomen spielt, wenn es auf RNA-Niveau annähernd nicht exprimiert wird, liegt nahe.

In Bezug auf die untersuchten *H. pylori*-Gastritiden stellt die eigene Untersuchung eine schlüssige Ergänzung zu einer Untersuchung von der Gruppe um D'Elis et al. dar. Sie hatten gezeigt, dass *H. pylori*-Gastritiden sowohl in Bezug auf die mRNA (aus gastralen Biopsien) als auch auf das Protein (Zytokinproduktionsprofil isolierter, vermehrter T-Zellen aus antralen Biopsien) eine hohe  $IFN-\gamma$ - und keine IL-4-Expression aufweisen, somit ein  $T_H1$ -Profil vorliegt (D'Elis et al. 1997). Dieses Ergebnis wird durch die hier vorgelegten Daten an einer größeren Fallzahl bestätigt und ergänzt um die Aussage, dass sich in MALT-Lymphomen eine ähnliche  $IFN-\gamma$  und IL-4 mRNA-Expression wie in *H. pylori*-Gastritiden zeigt. Diskutiert werden muss, dass der  $IFN-\gamma$ -Expressionsnachweis aus Biopsien nicht nur aus  $T_H$ -Zellen, sondern u.a. von CD8+ Zellen stammen könnte. In diesem Fall läge möglicherweise keine polarisierte  $T_H$ -Zellantwort vor bzw. könnte diesbezüglich keine sichere Aussage getroffen werden. Allerdings wiesen D'Elis et al. den zur mRNA-Expression konsistenten Nachweis der  $IFN-\gamma$  Proteinproduktion in CD4+ T-Zellklonen aus den entsprechenden gastralen Biopsien nach; ein Hinweis darauf, dass die Verfälschung der Ergebnisse durch  $IFN-\gamma$  Produktion anderer Zellen nicht relevant ist. Es bleibt anhand der eigenen Untersuchung die Schlussfolgerung, dass in MALT-Lymphomen ein  $T_H1$ -Zytokinprofil exprimiert wird. Dies wird mit der Einschränkung postuliert, dass es sich um Daten auf mRNA-Niveau ohne zellspezifischen (CD4)  $IFN-\gamma$  Nachweis handelt.

Die T-Zellen der *H. pylori*-Gastritis weisen ein  $T_H1$ -Profil auf. Exprimierten die MALT-Lymphome hingegen ein  $T_H2$ -Profil, so grenzten sie sich gerade durch dieses

Merkmal von den *H. pylori*-Gastritiden ab. Die T<sub>H</sub>2-Zytokine könnten den Proliferationsvorteil der B-Zellen der MALT-Lymphome bedingen bzw. aufrechterhalten. Es gilt als erwiesen, dass in unterschiedlichen malignen Tumorerkrankungen (Karzinomen sowie hämatologischen Tumorerkrankungen) im murinen Modell wie auch beim Menschen lokal und peripher T<sub>H</sub>2-Zytokinprofile exprimiert werden. Für zahlreiche Tumore konnte nach erfolgter Therapie eine Verschiebung von der T<sub>H</sub>2- zur T<sub>H</sub>1-Antwort festgestellt werden, was als weiterer Hinweis für die pathologische Bedeutung der T<sub>H</sub>2-Antwort in malignen Tumorerkrankungen dienen kann. Die T<sub>H</sub>1-Antwort könnte hingegen protektiv wirken, unter anderem über die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CD8), die Tumorzellen unschädlich machen können (Shurin et al. 1999). Die Tatsache, dass Tumorerkrankungen überwiegend mit einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort einhergehen und dass T<sub>H</sub>2-Zytokine, im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1-Zytokinen, physiologischerweise die B-Zellproliferation fördern, kann vermuten lassen, dass in MALT-Lymphome ein T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil exprimiert wird. Auch fehlt, neben der Aufrechterhaltung des chronisch-inflammatorischen Prozesses der Gastritis durch T<sub>H</sub>1-Zytokine, ein überzeugendes theoretisches Konzept, wie T<sub>H</sub>1-Zellen pathophysiologisch zur Progression von MALT-Lymphom-B-Zellen beitragen könnten. Eine interessante aktuellere Studie von Yamasaki et al. hat die Sekretion von Zytokinen (mittels ELISA) in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Patienten mit MALT-Lymphomen, *H. pylori*-Gastritiden und gesunden Kontrollpersonen verglichen. Nach Stimulation mit IL-4 und GM-CSF produzierten die PBMCs der MALT-Lymphompatienten signifikant höhere Spiegel von IL-4 als die der gesunden Kontrollpersonen und der Gastritiden. IFN- $\gamma$  wurde in allen drei Gruppen nur niedrig exprimiert (Yamasaki et al. 2004). Diese Ergebnisse können als Hinweis auf eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort in MALT-Lymphompatienten gewertet werden.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Untersuchungen (einschließlich der eigenen), die einen direkten Nachweis von Interleukinen auf Protein bzw. mRNA-Niveau in MALT-Lymphomen angestrebt haben, rückschließen, dass ein T<sub>H</sub>1-Profil exprimiert wird (Ausnahme: Knörr et al., siehe 1.1.4). Die Zellkulturversuche von Greiner et al., die Untersuchung von Yamasaki et al. sowie theoretische Überlegungen favorisieren die These, dass die tumorinfiltrierenden T<sub>H</sub>-Zellen über

T<sub>H</sub>2-Zytokine die B-Zellproliferation der MALT-Lymphome begünstigen könnten. Die Fragestellung bleibt somit zum aktuellen Zeitpunkt unzureichend beantwortet.

Der Schwerpunkt der Forschung konzentriert sich aktuell auf die eingangs (1.1.3.2) skizzierten molekulargenetischen Veränderungen in Lymphomen vom MALT-Typ, die nahe legen, dass für einen Teil der MALT-Lymphome im Verlauf der Erkrankung eine Tumorzellproliferation unabhängig vom Antigenstimulus (damit ebenfalls unabhängig von den T<sub>H</sub>-Zellen) pathologisch relevant wird. Unter diesem Blickwinkel tritt die Frage nach den Mechanismen der antigenabhängigen T-Zellhilfe für MALT-Lymphome in den Hintergrund. Lucas et al. konnten bezüglich der relevanten Translokationen (11;18) und (1;14) zeigen, dass ein physiologischer Zusammenhang zwischen den zwei von den Translokationen betroffenen Genen Bcl 10 und MALT1 besteht: ihre Proteine bilden einen Komplex, der die Kaspase-ähnliche Domäne in MALT1 aktiviert, was in der Folge zur Aktivierung des I $\kappa$ B Kinase-Komplexes (IKK) und von NF- $\kappa$ B führt (Lucas et al. 2001).

Als Folge der t(11;14) wird Bcl 10 überexprimiert und NF- $\kappa$ B über den oben skizzierten Weg aktiviert. Als Folge der t(11;18) kann das API2-MALT1 Fusionsprodukt, unabhängig von Bcl 10, über den I $\kappa$ B Kinase-Komplex NF- $\kappa$ B aktivieren (Lucas et al. 2001; Uren et al. 2000). Damit betreffen zwei unabhängige in MALT-Lymphomen auftretende Translokationen denselben Signalweg und münden in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B wurde in den letzten Jahren als ein wesentlicher Faktor in der Generierung einer effektiven Immunantwort erkannt: er ist ein Transkriptionsfaktor für Gene, die in der Regel einen Überlebensvorteil bedingen, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Apoptoseinhibitoren und Zelladhäsionsmoleküle (Lucas et al. 2004). Seine Bedeutung für Zellwachstum und Onkogenese wurden diskutiert (Mayo et al. 2000). Es erscheint möglich, dass die t(11;18) und die t(1;14) über die übermäßige Aktivierung von NF- $\kappa$ B in MALT-Lymphomen zu Transformation und Lymphomprogression beitragen können.

In diesem Zusammenhang konnten Liu et. al. 2001 eine mögliche klinische Bedeutung der genetischen Aberrationen aufweisen: an einem kleinen MALT-Lymphomkollektiv von 22 Patienten zeigten sie, dass die t(11;18) überwiegend bei fortgeschrittenen Lymphomen ( $\geq$  Stadium II<sub>E</sub>) und bei Lymphomen, die nach *H. pylori*-Eradikation keine Regression zeigen, nachzuweisen ist (Liu et al. 2001).

Diese Ergebnisse wurden durch eine Multicenterstudie mit 111 MALT-Lymphom-Patienten bestätigt (Liu et al. 2002). Eventuell kann die t(11;18) als Marker für Lymphome angesehen werden, die nicht auf eine Eradikationstherapie ansprechen. Möglicherweise benötigen sie den *H. pylori*-Antigenstimulus für ihr Wachstum nicht mehr. Das API2-MALT1 Fusionsprodukt der t(11;18) könnte hierbei die Antigen-Rezeptor-Signalwege umgehen, indem es direkt, unabhängig vom *H. pylori*-Antigenstimulus, NF- $\kappa$ B aktiviert. Interessant und klinisch relevant ist, ob sich diese Theorie bestätigen lassen wird: dann könnten über die Bestimmung der t(11;18) die MALT-Lymphompatienten erkannt werden, für die zusätzliche Therapiestrategien (z. B. Chemotherapie) Anwendung finden müssen.

Es bleibt unbestritten, dass die MALT-Lymphom-B-Zellen auf eine Form der T-Zellhilfe durch die tumorinfiltrierenden T<sub>H</sub>-Zellen angewiesen sind. In Anbetracht der Tatsache, dass für viele Tumorerkrankungen übereinstimmend ein T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil nachgewiesen wurde, erscheint es möglich, dass die T-Zellhilfe über die Produktion von Zytokinen erfolgt. Die Datenlage bezüglich der T<sub>H</sub>-Immunantwort in MALT-Lymphomen ist weiter uneindeutig (s.o.). Hier könnten weitere Studien, die die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Balance auf T-Zellniveau untersuchen, nützlich sein. Dies ist insbesondere in Hinsicht auf eventuelle therapeutische Ansätze von Relevanz, die die Verschiebung der T<sub>H</sub>-Immunantwort zum Ziel haben. Da die MALT-Lymphome, die nicht von der Translokation t(11;18) betroffen sind, auf den Entzug des Antigens *H. pylori*, das via T-Zellen die Tumorprogression begünstigt, mit einer Regression reagieren, kann vermutet werden, dass die Abhängigkeit der Lymphome vom MALT-Typ von der T<sub>H</sub>-Zellhilfe vorwiegend ein in frühen Lymphomstadien relevantes Phänomen ist, dass mit fortschreitenden genetischen Aberrationen an Bedeutung verliert.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Lymphome des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (Lymphome vom MALT-Typ) entwickeln sich aus sekundärem lymphatischem Gewebe. Im Magen entsteht dieses sekundäre MALT als Folge einer chronischen Infektion mit *Helicobacter pylori*. Die MALT-Lymphome des Magens machen etwa 8 % aller Non-Hodgkin-Lymphome aus. MALT-Lymphompatienten sind in mehr als 90 % der Fälle mit *H. pylori* infiziert und mittels Eradikation von *H. pylori* kann in vielen Fällen eine Regression des Lymphoms erreicht werden. Nichtneoplastische tumorinfiltrierende CD4 positive T-Lymphozyten (T-Helferzellen, T<sub>H</sub>-Zellen) reagieren spezifisch mit dem infizierenden *H. pylori*-Stamm und unterstützen in der Folge die Proliferation der B-Zellen des MALT-Lymphoms. Auf der Grundlage von Zellkulturversuchen und Zytokinexpressionsuntersuchungen wurde vermutet, dass die Hilfe der tumorinfiltrierenden T<sub>H</sub>-Zellen für die MALT-Lymphomzellen über die Sekretion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen erfolgt.

T<sub>H</sub>-Zellen können nach ihrem Zytokinproduktionsprofil in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen differenziert werden; als Markerinterleukine gelten Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) für T<sub>H</sub>1-Zellen bzw. Interleukin-4 (IL-4) für T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen können als polarisierte Formen der spezifischen Immunantwort angesehen werden; die deutlichsten Ausprägungen der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Dichotomie finden sich in chronischen Erkrankungsstadien. Die Erkrankungen des atopischen Formenkreises, insbesondere das Asthma bronchiale, wurden als sicher T<sub>H</sub>2-vermittelt erkannt. Viele Untersuchungen konnten eine Assoziation zwischen dem Asthma bronchiale und Polymorphismen im IL-4 Rezeptor  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) nachweisen. Aufgrund dieser Assoziation und der Tatsache, dass IL-4 seine Wirkung (u.a. die T<sub>H</sub>2-Zellantwort induzierende) über den IL-4R $\alpha$  entfaltet, sowie Hinweisen auf eine gesteigerte Signaltransduktion über den Rezeptor bei Vorliegen von IL-4R $\alpha$  Polymorphismen, wurde postuliert, dass sich (einzelne) IL-4R $\alpha$  Polymorphismen begünstigend auf die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Zellantwort auswirken könnten.

Unter der Annahme, dass die Entwicklung von MALT-Lymphomen mit einer lokalen T<sub>H</sub>2-Zellantwort einhergeht und in Anbetracht der Assoziation einzelner IL-



4R $\alpha$  Polymorphismen mit T<sub>H</sub>2-vermittelten Erkrankungen, wurden 99 MALT-Lymphompatienten und 120 Kontrollpersonen mittels einer allelspezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorliegen der sieben bekannten IL-4R $\alpha$  Polymorphismen untersucht. Bisher liegen nur wenige Daten zur Expression von Interleukinprofilen in MALT-Lymphomen vor. Deshalb wurde die mRNA Expression von IFN- $\gamma$  in je 15 und von IL-4 in je sieben MALT-Lymphomen und *H. pylori*-Gastritiden mittels einer quantitativen Real-Time-PCR untersucht. Die Validierung der Ergebnisse der allelspezifischen PCR erfolgte mittels Sequenzierung und ergab eine 100%ige Übereinstimmung, darüber hinaus korrelieren die erhobenen Allelfrequenzen der Kontrollgruppe mit den bekannten Allelfrequenzen in Normalpopulationen. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR waren ebenfalls valide reproduzierbar, wie anhand von Intra- und Interassays gezeigt werden konnte.

Es zeigte sich keine Assoziation eines IL-4R $\alpha$  Polymorphismus mit dem Vorliegen von MALT-Lymphomen. Sollte in Lymphomen vom MALT-Typ ein T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil vorliegen, scheinen andere Mechanismen bzw. Prädispositionen als IL-4R $\alpha$  Polymorphismen diese Polarisierung zu bedingen.

Die Real-Time-PCR zeigte bezüglich der IFN- $\gamma$  und IL-4 mRNA-Expression in MALT-Lymphomen und *H. pylori*-Gastritiden keine Unterschiede: bei fehlendem IL-4 Nachweis wurde IFN- $\gamma$  konstant nachgewiesen. Da die *H. pylori*-Gastritiden als T<sub>H</sub>1-assoziierte Erkrankungen gelten und IL-4 in den MALT-Lymphomen nicht nachzuweisen war, sprechen die hier vorgelegten Daten für das Vorliegen eines T<sub>H</sub>1-Zytokinprofils in Lymphomen vom MALT-Typ. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Zellkulturversuchen und theoretischen Überlegungen, die eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort in MALT-Lymphomen nahe legen, passt sich aber gut ein in eine Reihe von Untersuchungen, die in Bezug auf den direkten Zytokinnachweis in MALT-Lymphomen ebenfalls zu dem Ergebnis einer IFN- $\gamma$ /(T<sub>H</sub>1) Dominanz kommen.

Zurzeit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die Lymphome vom MALT-Typ zu den mit einer polarisierten T<sub>H</sub>-Immunantwort einhergehenden Erkrankungen gehören. Unbestritten bleibt jedoch, dass die MALT-Lymphom-B-Zellen auf eine Form der T-Zellhilfe durch die tumorinfiltrierenden T<sub>H</sub>-Zellen angewiesen sind. Die aktuelleren Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass dieses Phänomen vor allem

in frühen Stadien des MALT-Lymphoms relevant ist und mit dem Auftreten von genetischen Aberrationen wie der Translokation (1;18) an Bedeutung verliert.

### 5.2 Englische Zusammenfassung

Lymphomas of the mucosa-associated lymphatic tissue (lymphomas of the MALT type) develop from secondary lymphatic tissue. This secondary MALT arises in the stomach as consequence of a chronic infection with *Helicobacter pylori*. MALT lymphomas of the stomach account for around 8 % of all Non-Hodgkin's lymphoma. MALT lymphoma patients are infected with *H. pylori* in more than 90% of the cases and in many cases regression of the lymphoma can be achieved by eradication of *H. pylori*. Non-neoplastic tumour-infiltrating CD4 positive T-lymphocytes (T helper cells, Th cells) react specifically with the infecting *H. pylori* strain and support as a consequence the proliferation of the B cells of the MALT lymphoma. It is assumed on the basis of cell culture tests and cytokine expression examinations that the help of the tumour-infiltrating Th cells given to the MALT lymphoma cells occurs through the secretion of Th2 cytokines.

Th cells can be differentiated into Th1 and Th2 cells according to their cytokine production profile, as marker interleukins are considered interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) for Th1 cells and interleukin-4 (IL-4) for Th2 cells. Th1 and Th2 cells can be viewed as polarised forms of specific immune response; the clearest signs of Th1/Th2 dichotomy are found in chronic stages of disease. Diseases of the atopic syndrome, especially bronchial asthma, have been recognized as surely Th2-mediated. Many studies could prove an association between bronchial asthma and polymorphisms in the IL-4 receptor  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ). Because of this association and the fact that IL-4 develops its effect (including the Th2 cell response inducing effect) through the IL-4R $\alpha$ , as well as indications of an increased signal transduction through the receptor in the presence of IL-4R $\alpha$  polymorphisms, it has been postulated that (individual) IL-4R $\alpha$  polymorphisms could have a favourable effect on a Th2 cell response.

Under the assumption that the development of MALT lymphomas is connected with a local Th2 cell response and in view of the association of individual IL-4R $\alpha$  polymorphisms with Th2-mediated diseases, 99 MALT lymphoma patients and 120 control persons were examined by means of an allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for the presence of the seven known IL-4R $\alpha$  polymorphisms. So far

only a few data on the expression of interleukin profiles in MALT lymphomas are available. Therefore the mRNA expression of IFN- $\gamma$  in 15 and of IL-4 in seven MALT lymphomas and *H. pylori* gastritis cases each was examined by means of a quantitative real-time PCR. The validation of the results of the allele-specific PCR was by means of sequencing and resulted in a 100% agreement, moreover the acquired allele frequencies of the control group correlate with the known allele frequencies in the normal population. The results of the real-time PCR were also reproducibly valid, as could be shown by reference to intraassays and interassays.

No association of an IL-4R $\alpha$  polymorphism with the presence of MALT lymphomas was shown. Should a Th2 cytokine profile be present in lymphomas of the MALT-type, mechanisms or predispositions other than IL-4R $\alpha$  polymorphisms appear to cause this polarisation.

The real-time PCR showed no difference with regard to the IFN- $\gamma$  and IL-4 mRNA expression in MALT lymphomas and *H. pylori* gastritis: with lack of IL-4 evidence IFN- $\gamma$  was detected constantly. Since *H. pylori* gastritis is considered to be a Th1-associated disease and IL-4 could not be detected in the MALT lymphomas, the data submitted here speak for the presence of a Th1 cytokine profile in lymphomas of the MALT-type. This result stands in contradiction to cell culture studies and theoretic considerations that suggest a Th2 immune response in MALT lymphomas, but fits well in a number of studies that with regard to the direct cytokine evidence in MALT lymphomas also point to an IFN- $\gamma$ /(Th1) dominance.

Currently it cannot be assessed finally whether lymphomas of the MALT-type belong to the diseases associated with a polarised Th immune response. However, it remains undisputed that MALT lymphoma B cells rely on a form of T cell help by the tumour-infiltrating Th cells. The more current research results indicate that this phenomenon is relevant primarily in early stages of MALT lymphoma and loses significance with the appearance of genetic aberrations such as translocation (1;18).

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, et al. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE (1997): t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 8(10): 979-85.
- Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, De Wolf-Peeters C (2000): The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* 156(4):1433-9.
- Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M (1995): Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* 345: 1591-1594.
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Chen XH, Patel BK, Wang LM, Frankel M, Ellmore N, Flavell RA, LaRochelle WJ, Pierce JH (1997): Jak1 expression is required for mediating interleukin-4-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate and Stat6 signaling molecules. *J Biol Chem* 272: 6556-6560.
- Chomarat P, Banchereau J (1997): An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8: 333-344.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Christodoulopoulos P, Cameron L, Nakamura Y, Lemiere C, Muro S, Dugas M, et al. (2001): TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol* 107(4):586-91.
- Cogliatti SB, Schmid U, Schumacher U, Eckert F, Hansmann ML, Hedderich J, et al. (1991): Primary B-cell gastric lymphoma: A clinicopathological study of 145 patients. *Gastroenterology* 10: 1159-1170.
- Constant SL, Bottomly K (1997): Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322.
- D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, et al. (1997): T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 158: 962-967.
- D'Elios MM, Amedei A, Manghetti M, et al. (1999): Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 117(5): 1105-12.
- Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J (1997): Common Polymorphisms in the coding part of the IL-4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 696-697.
- Del Prete GF (1998): The concept of type-1 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* 16: 427-455.
- Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, et al. (1991): Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 88: 346-350.
- Del Prete GF, De Carli M, Ricci M, Romagnani S (1991): Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J Exp Med* 174: 809-813.
- Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, et al. (1999): The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 93: 3601-3609.
- Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L (1995): The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood* 86: 4587-4593.

- Du M, Diss TC, Yu C, Peng H, et al. (1996): Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leuk* 10: 1190-1197.
- Eck M, Schmausser B, Haas R, Greiner A, Czub S, et al. (1997): MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 112: 1482-1486.
- Eidt S, Stolte M, Fischer R (1994): *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 47: 436-439.
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. (2000): Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404(6776): 398-402.
- Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A (1995): MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol* 147(1): 217-22.
- Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, Bartsch B, Atreya R, Schmitt E, Galle PR, Renz H, Neurath MF (2001): Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* 193(11): 1247-60.
- Fischbach W (1999): MALT lymphoma of the stomach: current state and perspectives. *Dtsch Med Wochenschr* 124: 1142-27.
- Fischbach W (2000): Primary gastric lymphoma of MALT: Considerations of pathogenesis, diagnosis and therapy. *Can J Gastroenterology* 14 (Suppl D): 44D-50D.
- Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M (2004): Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* (1):34-7.
- Franjkovic I, Gessner A, Konig I, Kissel K, Bohnert A, Hartung A, Ohly A, Ziegler A, Hackstein H, Bein G (2005): Effects of common atopy-associated amino acid substitutions in the IL-4 receptor alpha chain on IL-4 induced phenotypes. *Immunogenetics* 56(11):808-17.
- Gascoyne RD (2003): Molecular pathogenesis of Mucosal-Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44: 13-20.
- Gessner A, Röllinghoff M (2000): Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201: 285-307.
- Greiner A, Knorr C, Qin Y, Sebald W, Schimpl A, Banchereau J, Muller-Hermelink HK (1997): Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation. *Am J Pathol* 150: 1583-1593
- Grimbacher B, Holland SM, Puck JM (1998): The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 338(15): 1073-4.
- Hackstein H, Hofmann A, Bohnert A, Bein G (1999): Definition of human Interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers. *Hum Immunol* 60: 1119-1127.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein ES, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5): 1361-1392.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold G, Flandrin G, et al. (1999): The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann Oncol* 10,1419-32.
- Hauer AC, Finn TM, et al. (1997): Analysis of TH1 and TH2 cytokine production in low grade B cell gastric MALT-type lymphomas stimulated in vitro with *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 50(11): 957-9.
- Hellmig S, Vollenberg S, Goebeler-Kolve ME, et al. (2004): IL-1 gene cluster polymorphisms and development of primary gastric B-cell lymphoma in *Helicobacter pylori* infection. *Blood* 104(9):2994-5.

- Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Folsch UR, Hampe J, Schreiber S (2005): Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma* 46(6):869-72.
- Hershey Gk, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA (1997): The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4receptor. *N Engl J Med* 337: 1720-1725.
- Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Willson TA (1996): Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(1): 497-501.
- Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH (1996): The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85(7): 973-83.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(16): 7276-80.
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL (1994): An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4Stat. *Science* 265: 1701-1706.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993): Development of TH1 CD 4+ T cells trough IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J (1993): The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342: 571-574.
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J (1996): *Helicobacter pylori*-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol* 178: 122-127.
- Hyjek E, Smith WJ, Isaacson PG (1988): Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Hum Pathol* 19: 766-776.
- Hyjek E, Isaacson PG (1988): Primary B-cell lymphoma of the thyroid and ist relationship to Hashimoto`s thyroiditis. *Hum Pathol* 19: 1315-1326.
- Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, et al. (1990): Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 171: 861-873.
- Isaacson PG (1999a): Gastric MALT lymphoma: From concept to cure. *Ann Oncol* 10: 637-645.
- Isaacson PG (1999b): Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* 36: 139-147.
- Isaacson PG (1999c): Gastrointestinal Lymphomas of T- and B-Cell Types. *Mod Pathol* 12(2): 151-158.
- Isaacson P, Wright DH (1983): Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 52: 1410-1416.
- Isaacson P, Wright DH (1984): Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer* 53: 2515-2524.
- Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr, Murphy KM (1995): Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3 and Stat 4. *J Exp Med* 181: 1755-1762.
- Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR (1995): Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154(8):4187-94.
- Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, et al. (1998): Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 1298-1300.
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ (1996a): Stat 6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4: 313-319.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ (1996b): Impaired IL-12 responses and enhanced development

of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382: 174-177.

Keegan AD, Nelms K, White M, Wang LM, et al. (1994): An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 76: 811-820.

Kim JI, Grusby MJ, Glimcher LH (1999): The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10: 745-751.

Knörr C, Amrehn C, Seeberger H, Rosenwald A, Stilgenbauer S, Ott G, Müller-Hermelink HK, Greiner A (1999): Expression of costimulatory molecules in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas in vivo. *Am J Pathol* 155(6): 2019-27.

Koch P, Schmoll HJ (1999): Primäre gastrointestinale Non-Hodgkin-Lymphome. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg): *Kompodium Internistische Onkologie*, Band 2, Auflage 3, Springer, 380-407.

Kolve M, Fischbach W, Greiner A, Wilms K (1999): Differences in endoscopic and clinicopathological features of primary and secondary gastric non-Hodgkin's lymphoma. German Gastrointestinal Lymphoma Study Group. *Gastrointest endosc* 49: 307-315.

Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K (1993): Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262: 1874-1877.

Kopf M, Le Gros, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G (1993): Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362: 245-248.

Koulis A, Diss T, Isaacson PG, Dogan A (1997): Characterization of tumour-infiltrating T lymphocytes in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 151: 1353-1360.

Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (1999): The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96: 365-371.

Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, Arai N (1999): Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11(6): 677-88.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21(16): 3761-6.

Le Gros G, Ben-Sasson SZ, et al. (1990): Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172: 921-929

Liu H, Ruskon-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, Ye H, Molina T, Bouhnik Y, Hamoudi RA, Diss TC, Dogan A, et al. (2001): Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 357(9249): 39-40.

Liu H, Ye H, Ruskon-Fourmestraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wuendisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas T, et al. (2002): T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 122(5):1286-94.

Lohoff M, Röllinghoff M, Sommer F (2000): *Helicobacter pylori* gastritis: a Th1 mediated disease? *J Biotechnol* 83: 33-36.

Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G (2001): Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 276(22): 19012-9.

Lucas PC, McAllister-Lucas LM, Nunez G (2004): NF-kappaB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. *J Cell Sci* 117:31-9.

Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M (2001): Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 121(4):823-9.

Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, et al. (1992): Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148: 2142-2147.

- Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Rerrante J, et al. (1996): IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481.
- Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, et al. (1994): Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 179: 1273-1283.
- Marshall BJ, Warren JR (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
- Mayo MW, Baldwin AS (2000): The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 1470(2):M55-62.
- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, et al. (1998): Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 19(2): 119-20.
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y et al. (1999): Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 162(3): 1227-31.
- Mohrs M, Ledermann B, Kohler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F (1999): Differences between IL-4 and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 162: 7302-7308.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
- Mosmann TR, Sad S (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146.
- Mowen KA, Glimcher LH (2004): Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev.* 202: 203-22.
- Mucci LA, Wedren S, Tamimi RM, Trichopoulos D, Adami HO (2001): The role of gene-environment interaction in the aetiology of human cancer: examples from cancers of the large bowel, lung and breast. *J Intern Med* 249(6):477-93.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1985): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-273.
- Musshoff K (1977): Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Strahlentherapie* 153: 218-221.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999): The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701-738.
- Neubauer A, Thiede C, Morgner A, Alpen B, Ritter M, Neubauer B, Wundisch T, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E (1997): Cure of *Helicobacter pylori* infection and duration of remission of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 89(18):1350-5.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH (2002): The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8(6): 567-73.
- Noben-Trauth N, Paul WE, Sacks DL (1999): IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J Immunol* 162(10):6132-40.
- Noguchi E., Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y et al. (1999): No association between atopy/asthma and the IL50Val polymorphism of IL- 4 receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 160(1): 342-5.
- Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, et al. (2000): Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 66(2): 517-26.
- O'Garra A, Arai N (2000): The molecular basis of T helper 1 and Thelper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10(12): 542-50.
- Oiso N, Fukai K, Ishii M (2000): Interleukin 4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol* 142(5):1003-6.



- Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, et al. (1997): The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue(MALT)-type. *Cancer Res* 57: 3944-3948.
- Ott G, Kalla J, Steinhoff A, Rosenwald A, Katzenberger T, et al. (1998): Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Pathol* 153: 689-694.
- Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM (2000): Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12(1): 27-37.
- Paliard X, De Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, De Vries J, Spits H (1988): Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 141: 849-855.
- Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD (1994): Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330: 1267-1271.
- Paul WE (1991): Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859-1870.
- Paul WE, Seder RA (1994): Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.
- Peng H, Diss T, Isaacson PG, Pan L (1997): c-myc gene abnormalities in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. *J Pathol* 181: 381-386.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL (1993): Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395.
- Quelle FW, Shimoda K et al. (1995): Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol* 15(6):3336-43.
- Qin Y, Geiner A, Trunk MJ, Schmausser B, Ott MM, et al. (1995): Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. *Blood* 86: 3528-3534.
- Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P (1992): Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 102: 1628-1638.
- Reiner SL, Locksley RM (1995): The regulation of immunity to Leishmania major. *Annu Rev Immunol* 13: 151-177.
- Riedel S, Kraft M, Kucharzik T, Pauels HG, Tiemann M, Steinbuchel A, Domschke W, Luger N. (2001): CD4+ Th1-cells predominate in low-grade B-cell lymphoma of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT type). *Scand J Gastroenterol* 36(11): 1198-203.
- Rohatiner A, d'Amore F, Coiffier B, Crowther D, Gospodarowicz M, Isaacson P, Lister TA, Norton A, Salem P, Shipp M, et al. (1994): Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classification of gastrointestinal tract lymphoma. *Ann Oncol* 5: 397-400.
- Rollinson S, Levene AP, Mensah FK, Roddam PL, Allan JM, Diss TC, Roman E, Jack A, MacLennan K, Dixon MF, Morgan GJ (2003): Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood* 102(3):1007-11.
- Romagnani S (1999): Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5: 285-294.
- Romagnani S (2000): The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105: 399-408.
- Russel SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, et al. (1993): Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262: 1880-1883.
- Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, Wang LH, Garfein E, Rothman P, Nelms K, Paul WE (1996): Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of th human IL-4 receptor. *Immunity* 4: 123-132.
- Sackmann M, Morgner A, Rudolph B, Neubauer A, Thiede C, Schulz H, Kraemer W, Boersch G, Rohde P,

- Seifert E, Stolte M, Bayerdoerffer E (1997): Regression of gastric MALT lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori* is predicted by endosonographic staging. MALT Lymphoma Study Group Gastroenterology 113: 1087-1090.
- Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM (1990): Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. J Exp Med 171: 115-127.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.
- Schild T (Vers. 2.1): Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. PE Applied Biosystems.
- Schmitz J, Thiel A, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Assenmacher M, Radbruch A (1994): Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. J Exp Med 179: 1349-1353.
- Schulte T, Kurrle R, Rölinghoff M, Gessner A (1997): Molecular characterization and functional analysis of murine interleukin 4 receptor allotypes. J Exp Med 186: 1419-1429.
- Secrist h, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT (1993): Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in Cd4+ T cells from allergic individuals. J Exp Med 178: 2123- 2130.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B (1992): The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. J Exp Med 176: 1091-1098.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE (1993): Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10188-10192.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN (1996): Lack of IL-4 induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat 6 gene. Nature 380: 630-633.
- Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT (1999): Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin Immunopathol 21(3): 339-59.
- Stephenson L, Johns MH, Woodward E, Mora AL, Boothby M (2004): An IL-4R alpha allelic variant, I50, acts as a gain-of-function variant relative to V50 for Stat6, but not Th2 differentiation. J Immunol 173(7): 4523-8.
- Stolte M, Eidt S (1989): Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*? J Clin Pathol 42: 1269-1271.
- Sugamura K, Asao H, Kondo M, Ishii N, Nakamura M, Takeshita T (1995): The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. Adv Immunol 59: 225-277.
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G (1990): IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol 145: 3796-3806.
- Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Suzuki Y, Nishima S, Izuhara K, Hamasaki N (2000): Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL- 4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor I beta gene. Exp Clin Immunogenet 17(2): 63-70.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1996): Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. Nature 380: 627-630.
- Tiede C, Alpen B, Morgner A, Schmidt M, Ritter M, Ehninger G, Stolte M, Bayerdörffer E, Neubauer A (1998): Ongoing somatic mutations and clonal expansion after cure of *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. J Clin Oncol 16: 3822-3831.

- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 89: 3909-3918.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN (1996): Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382: 171-174.
- Trinchieri G (1995): Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-276.
- Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, Finkelman FD (1998): IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8(2): 255-64.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000): Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6(4): 961-7.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad USA* 76: 615-619.
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ (1999): Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96(1): 35-45.
- Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG (1991): *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338: 1175-1176.
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG (1993): Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342: 575-577.
- Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG (1995): Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 85: 2000-2004.
- Wündisch T, Thiede C, Morgner A, Dempfle A, Gunther A, Liu H, Ye H, Du MQ, Kim TD, Bayerdorffer E, Stolte M, Neubauer A (2005): Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* 23(31): 8018-24.
- Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ (2002): Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J Biol Chem* 277(30): 27169-75.
- Wyatt JJ, Rathbone BJ (1988): Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 142: 44-49.
- Yamasaki R, Yokota K, Okada H, Hayashi S, Mizuno M, Yoshino T, Hirai Y, Saitou D, Akagi T, Oguma K (2004): Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J Med Microbiol* 53(Pt 1): 21-9.
- Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A (1999): Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11(4): 473-82.
- Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger D et al. (1999): Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 22(1): 63-8.
- Zheng W, Flavell RA (1997): The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89(4): 587-96.
- Zucca E, Bertonni F, Roggero E, Cavalli F (2000): The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* 96: 410-419.

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Feuser, Gotzen, Giese, Griss, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Krieg, Lennartz, Mueller, Müller, Niessing, Oertel, Schmidt, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Vohland, Voigt, Weihe.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Innsbruck:

Benke, Dierich, Dietze, Fritsch, Glossmann, Göttinger, Hinterhuber, Jaschke, Kofler, Mikuz, Pfeiffer, Prodinger, Puschendorfer, Striessnig, Winkler, Zorowka.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren in Clermont-Ferrand:

Levai, Escande.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren in Kassel:

Kuhn, Löser.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Neubauer für die Betreuung der Arbeit und bei Frau Dr. Birgit Grassl für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein Dank gilt auch Dr. med. Theo Daniel Kim für Hilfestellung und Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen sowie Dr. med. Thomas Wündisch für die Unterstützung bei patientenorientierten Fragestellungen.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors der Abteilung Hämatologie/Onkologie/Immunologie des Klinikums Marburg, insbesondere Frau Kathleen Stabla, für ihre freundliche und kompetente Hilfsbereitschaft sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Dr. med. Seifart, Dr. med. Dierlamm und Dr. med. Meier danke ich für die Überlassung von Proben.

Für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen danke ich Frau Dr. sc. hum. Weiss, Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung der Medizinischen Fakultät Mannheim.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie sowie insbesondere meinem Mann Tarik Amari für die moralische Unterstützung.